

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 EM MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital.

Co-orientador: Prof. Dr. Hidevaldo Bueno Machado.

CURITIBA

2005



P A R E C E R

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 EM MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO”, de autoria do Pós-Graduando MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, e composta pelos Professores Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (UFPR), Dr^a. Monica Levy Andersen (UNIFESP), Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica - UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi Aprovado. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela orientadora. Em Curitiba, 13 de dezembro de 2005.

Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

Dr^a. Monica Levy Andersen

Dr. Silvio Marques Zanata



ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ao décimo terceiro dia do mês de dezembro do ano de dois mil e cinco, às 14 horas, no anfiteatro dez, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria do Pós-Graduando em Farmacologia, **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA**, intitulada: "ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 EM MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO", sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, e composta pelos professores: Dr^a. Monica Levy Andersen (UNIFESP), e Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica - UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APPROVADO. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi APPROVADO. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 13 de dezembro de 2005.

Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Orientadora)

Dr^a. Monica Levy Andersen (UNIFESP)

Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica - UFPR)

*“Um bom cientista valoriza a
crítica quase mais do que a amizade;
não, na ciência a crítica é o máximo
e a medida da amizade”.*

Francis Crick

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por nos dotar de capacidade para tentarmos compreender sua criação, e chamarmos a isso de ciência.

Agradeço a vida de todos os animais utilizados neste trabalho, e dizer que elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

Agradeço a minha esposa Ângela por estar a meu lado em todos os momentos, me amando e me dando força. Sem você seria impossível.

Agradeço a meus pais João e Irene por me educarem e amarem, permitindo e incentivando, desde minha infância, que eu fizesse com dedicação aquilo que eu amo.

Agradeço a minha orientadora e amiga Profa. Dra. Maria Vital pela orientação e confiança, mesmo quando os experimentos teimavam em não funcionar. Você é um grande exemplo.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Hidevaldo Bueno Machado que mesmo estando em outro continente sempre esteve presente em nosso trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Sívio Marques Zanata pela amizade, bom humor e disponibilidade em nos auxiliar, sempre com seu laboratório de portas abertas.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Farmacologia pelos grandes exemplos de profissionalismo, amor à ciência e doação pessoal. Em especial ao Prof. Dr. Roberto Andreatini e Prof. Dr. Cláudio da Cunha, que me acolheram como a um orientado, participando com grandes idéias e sugestões neste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Farmacologia, inclusive aos da limpeza, pois eles nos possibilitam condições adequadas de trabalho e são parte dele.

Agradeço a todos os meus amigos pós-graduandos, tanto do Departamento de Farmacologia, quanto do Departamento de Patologia Básica (lab. Prof. Dr. Zanata). Vocês fazem parte deste trabalho. Agradeço ao CNPq por proporcionar suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>DOENÇA DE PARKINSON</i>	1
1.2. <i>ALTERAÇÕES COGNITIVAS E DOENÇA DE PARKINSON</i>	2
1.3. <i>ETIOLOGIA</i>	3
1.4. <i>INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA DOENÇA DE PARKINSON</i>	4
1.4.1. Características estruturais das enzimas COX-1 e COX-2.....	7
1.4.2. COX-2 um modulador neuronal multifuncional.....	8
1.4.3. Cascatas regulatórias.....	10
1.4.4. A reação neuroinflamatória em pacientes parkinsonianos.....	13
1.4.5. Antiinflamatórios.....	14
1.5. <i>MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON</i>	16
1.5.1. MPTP	16
1.5.2. 6-OHDA.....	18
1.5.3. LPS	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. <i>OBJETIVO GERAL</i>	21
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	21

3.	<i>METODOLOGIA</i>	22
3.1.	<i>ANIMAIS</i>	22
3.2.	<i>DROGAS</i>	22
3.3.	<i>CIRURGIA ESTEREOTÁXICA</i>	22
3.4.	<i>TRATAMENTO FARMACOLÓGICO</i>	23
3.5.	<i>OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS</i>	24
3.5.1.	Campo aberto.....	24
3.6.	<i>ENSAIOS BIOQUÍMICOS</i>	25
3.6.1.	Extração de proteínas.....	25
3.6.2.	Dosagem de proteínas.....	25
3.6.3.	Precipitação de proteínas.....	25
3.6.4.	Western blotting.....	26
3.7.	<i>ANÁLISE DENSITOMÉTRICA</i>	26
3.8.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	27
4.	<i>RESULTADOS</i>	28
4.1.	<i>COMPARAÇÃO ENTRE MODELOS ANIMAIS: LPS, MPTP E 6-OHDA</i>	28
4.1.1.	Análise comportamental (Campo aberto).....	28
4.1.2.	Perfil de expressão de COX-2 induzida por LPS, MPTP e 6-OHDA.....	32
4.1.3.	Tratamento com indometacina dos animais lesados por MPTP.....	40
5.	<i>DISCUSSÃO</i>	44
6.	<i>CONCLUSÕES</i>	50
7.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	52
8.	<i>ANEXO</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	-	Acetilcolina
AINE	-	Antiinflamatório não esteroideal
AIE	-	Antiinflamatório esteroideal
ATV	-	Área tegmental ventral
COX-1	-	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	-	Ciclooxigenase tipo 2
DA	-	Dopamina
DOPAC	-	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	-	Doença de Parkinson
HVA	-	Ácido homovanílico
HOX	-	Endoperoxidase
Ig	-	Imunoglobulina
IL-1	-	Interleucina 1
iNOS	-	Óxido nítrico sintetase indutível

INF- γ	-	Interferon- γ
LPS	-	Lipopolissacarídeo
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPP ⁺	-	1-metil-4-fenilpiridina
NA	-	Noradrenalina
NO	-	Óxido nítrico
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
ROS	-	Espécies reativas do oxigênio
SNpc	-	Substância Negra parte compacta
TCA	-	Ácido tricloroacético
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral- α
TH	-	Tirosina Hidroxilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neuroinflamação constitui-se como um componente responsável pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP.....	6
Figura 2: Diferenças estruturais entre as enzimas COX-1 e COX-2.....	8
Figura 3: Via de biossíntese de prostaglandinas.....	12
Figura 4: Representação esquemática do metabolismo do MPTP e das vias do MPP ⁺ intracelular	17
Figura 5: Campo aberto.....	24
Figura 6: Comparação entre os tempos de latência de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS.....	27
Figura 7: Comparação entre as frequências de locomoção de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS.....	28
Figura 8: Comparação entre as frequências de levantar de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS.....	29
Figura 9: Comparação entre os tempos de imobilidade de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS.....	30
Figura 10: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após procedimento Sham.....	31
Figura 11: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após procedimento Sham.....	32

Figura 12: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de LPS.....	33
Figura 13: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de LPS.....	34
Figura 14: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de MPTP.....	35
Figura 15: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de MPTP.....	36
Figura 16: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de 6-OHDA.....	37
Figura 17: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de 6-OHDA.....	38
Figura 18: Efeitos da administração de IND no tempo de latência de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto.....	39
Figura 19: Efeitos da administração de IND na frequência de locomoção de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto.....	40
Figura 20: Efeitos da administração de IND na frequência de levantar de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto.....	41
Figura 21: Efeitos da administração de IND no tempo de imobilidade de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto.....	42

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma das mais comuns patologias neurodegenerativas. Diversas evidências dão suporte à existência de mecanismos relacionados à inflamação encefálica (neuroinflamação) em pacientes com DP.

A DP assim como seus modelos animais induzidos por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e lipopolissacarídeo (LPS) possuem como característica induzirem o aumento da expressão da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2). A expressão aumentada desta enzima tem sido observada em neurônios lesados e degenerados, o que sugere que a COX-2 contribua para o dano neuronal. Observamos que o LPS gerou aumento dos parâmetros exploratórios, enquanto que MPTP e 6-OHDA apresentaram efeitos prejudiciais nesta função. Também verificamos que o LPS gerou aumento de expressão de COX-2, na SN, 8 e 16 h após sua infusão. Já o MPTP provocou o aumento de expressão 16 h após sua infusão, enquanto que a 6-OHDA demonstrou maior intensidade nesse efeito, suscitando a indução de COX-2 de 4 a 24 h após a cirurgia. Não observamos qualquer variação significativa na expressão de COX-2 no estriado dos animais. Sugerimos que o LPS configurou-se como um modelo adequado da DP, do ponto de vista neuroinflamatório, por outro lado não gerou prejuízos motores. MPTP e 6-OHDA produziram alterações motoras e inflamatórias, de maneira tempo dependente. Visando compreender melhor os mecanismos da doença, utilizamos a indometacina no modelo do MPTP. Foi observado, 24 h após a infusão da neurotoxina, um possível efeito neuroprotetor. No entanto, 7 dias após verificou-se um prejuízo motor sugerindo alguma modulação na função dopaminérgica.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a neuroinflamação está presente nestes modelos animais de parkinsonismo. Mais ainda, o uso de antiinflamatórios deve ser melhor investigado para entender a participação destas drogas como possíveis agentes terapêuticos.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the one of the most commons neurodegenerative disorders. Several evidences indicated the existence of neuroinflammatory mechanisms, both in animal models and in human patients.

One common characteristic shared between MPTP, 6-OHDA, LPS PD models, and the disease is the ciclooxigenase-2 (COX-2) up-regulation in the brain. The increase on COX-2 expression has been reported in deleterious processes witch leads the brain tissue to a neuronal damage. According to this, we investigated the participation of COX-2 in the three different PD models described previously.

Our results indicated that LPS caused an induction increase of COX-2, in the SN, 8 and 16 h after the infusion. Besides, MPTP provoked that kind o increase, 16 h after their infusion, in addition, 6-OHDA demonstrated more intensity in that effect, with increased of COX-2 expression observed between 4 to 24 h after surgery. In the other hand, we did not detected variation on the COX-2 expression in the striatum of the rats.

Behavioral analyses, made for each tested model in the open field, shown that LPS induced an increase in the exploratory parameters, in an opposite way, MPTP and 6-OHDA evoked an impairment in that function.

Taken together, we suggest that LPS configurate as an adequate PD model, according to the neuroinflammatory point of view, nevertheless, LPS could not mimic the locomotor impairment associated with the disease. MPTP, and 6-OHDA models, satisfied both criteria: induction of COX-2 expression, in a time dependent manner, and reduction of locomotor activity.

We also tested indomethacin 10 mg/kg one hour before the surgery prevented the locomotor impairment elicited by MPTP, otherwise, a daily treatment was initiated (1 mg/kg) 24 h after surgery until seven days after, with a marked reduction of locomotor in the seven day. We suggest an interaction of indomethacin in the dopaminergic function of the rats, causing initially a beneficial effect, and finally impairment, observed seven days after the infusion of MPTP.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa progressiva que primariamente é caracterizada por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc), evidenciada macroscopicamente por uma despigmentação na porção ventrolateral desta estrutura (LANG e LOZANO, 1998; DUNNETT & BJORKLUND, 1999).

As características patológicas são referentes à perda de neurônios dopaminérgicos no estriado levando a uma depleção de dopamina (DA), bem como de seus metabólitos como o ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (LANG & LOZANO, 1998; DUNNETT & BJORKLUND, 1999). Outra característica patológica importante é a presença de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas, constituídas por várias estruturas de natureza protéica, denominadas corpos de *Lewy* (SHASTRY, 2001).

Em pacientes parkinsonianos, além do decréscimo de DA na via nigroestriatal, pode ocorrer também degeneração de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ATV) (AGID *et al.*, 1990), redução de noradrenalina (NA) nos neurônios do locus coeruleus (STOFF *et al.*, 1999), perda de serotonina (5-HT) no núcleo da rafe e redução de acetilcolina (ACh) no núcleo basal de Meynert (CANDY *et al.*, 1983).

O completo desenvolvimento da DP é definido por uma tríade de sinais tais como acinesia, rigidez e tremor muscular levando a instabilidade postural, no entanto, nem sempre se observa igual magnitude de manifestações. Estes sinais cardinais podem ser acompanhados por anormalidades posturais, sintomas vegetativos (aumento da salivação, seborréia, constipação, rubor, sudorese e distúrbios circulatórios), e distúrbios psico-orgânicos como depressão e demência (GERLACH & RIEDERER, 1996). O aparecimento desses sinais clínicos pode ser explicado pelas principais alterações morfológicas encontradas em cérebros

autopsiados de pacientes que sofriam de DP. Ou seja, esses pacientes apresentaram 60-75% de perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (JELLINGER, 1988). Por outro lado, pacientes com DP que manifestaram previamente quadros de demência, apresentaram 60-77% de perda de neurônios colinérgicos presentes no núcleo basal de Meynert, em comparação com indivíduos de igual idade, porém sem sintomas neurológicos ou fisiológicos aparentes (JELLINGER, 1991).

1.2. Alterações cognitivas e Doença de Parkinson

Além das alterações motoras e autonômicas, já foi demonstrado que os pacientes com DP apresentam redução dos processos cognitivos (LINDNER *et al.*, 1999). Segundo DUBOIS e PILLON (1997), a demência é encontrada em 15-20% dos casos de DP idiopático. Além disso, testes realizados com pacientes parkinsonianos verificaram a presença de quadros de depressão e ansiedade que provavelmente estão associados ao curso da doença (VALLDEORIOLA *et al.*, 1997).

Enquanto a DP é tradicionalmente descrita como um distúrbio motor, atualmente sabe-se que os sintomas não motores contribuem para a incapacitação dos pacientes. A deficiência cognitiva é um sintoma comum em pacientes com DP e tem sido frequentemente descrita nos estágios iniciais da doença quando as alterações motoras ainda não são evidentes (CALNE, 2001).

Os sintomas característicos da DP ocorrem somente após uma extensa degeneração da via nigroestriatal, e estas alterações motoras são resultado de uma progressiva perda neuronal associada a um declínio da neuroplasticidade e de mecanismos compensatórios (GERLACH & RIEDERER, 1996).

As alterações cognitivas encontradas nos pacientes com DP envolvem lentidão no processamento de informações e prejuízo na aquisição das memórias a curto prazo (VALLDERIOLA *et al.*, 1997).

1.3. Etiologia da DP

Apesar de vários esforços feitos para esclarecer a origem da doença sua etiologia permanece um mistério, dificultando desta forma a prevenção de sua ocorrência (HUNOT *et al.*, 2001; FERGER & TEISMANN, 2001).

De 5 a 10% dos casos da DP observa-se ligação entre a ocorrência da doença e mutações em um pequeno número de genes (forma familiar) (VILA & PRZEDBORSKI, 2004; HALD & LOTHARIUS, 2005).

Mutações na α -sinucleína são herdadas de maneira autossômica dependente, e as formas mutantes desta proteína apresentam uma ação tóxica nas células dopaminérgicas (DAWSON & DAWSON, 2003; ERIKSEN *et al.*, 2005). Uma completa supressão da α -sinucleína não resulta no desenvolvimento do fenótipo da DP (ERIKSEN *et al.*, 2005). Além do mais, CHANDRA *et al.*, (2004), demonstraram que a redução dos níveis da α -sinucleína é terapeuticamente possível, pois a redução da expressão desta proteína em camundongos é bem tolerada. A redução da expressão da α -sinucleína foi benéfica, pois preveniu a neurotoxicidade dopaminérgica mediada pelos altos níveis desta proteína prevenindo também a neurotoxicidade pela neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em camundongos (DAUER, 2002).

Tem-se demonstrado que a forma monogênica do parkinsonismo causado por mutações da parkina, uma proteína responsável pela via de ubiquitinação e degradação de proteínas associadas a formação de corpúsculos de Lewy, representa uma importante causa do parkinsonismo precoce sem histórico familiar, especialmente antes dos 30 anos de idade (Dawson, 2000). Entretanto, mesmo quando o início dos sintomas ocorre entre idades de 30 e 45 anos, a *parkina* ainda é responsável por 8% dos casos isolados de parkinsonismo. O fenótipo gerado pela *parkina* é variável, porém não pode ser distinguido de casos não derivados dela (PERIQUET *et al.*, 2003).

Apesar das diferentes características clínicas e patológicas das formas de manifestações da DP, ambas apresentam as mesmas anormalidades bioquímicas,

principalmente em relação à depleção do conteúdo de DA mesencefálico (PRZEDBORSKI, 2005).

Teoricamente, a neurodegeneração progressiva pode ser provocada por uma exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou por uma breve exposição que leva ao início de uma cascata de eventos deletérios (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). O fato de que um grupo de jovens intoxicados com MPTP desenvolveu uma síndrome semelhante à DP (LANGSTON, 1983) é um exemplo de como uma toxina exógena pode mimetizar as características clínicas e patológicas da doença. Além do MPTP, alguns fatores ambientais e ocupacionais como o herbicida paraquat, que é similar estruturalmente ao MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina) (MPP⁺ é o metabólito ativo do MPTP) e o inseticida rotenona, que apresenta toxicidade mitocondrial semelhante ao MPP⁺, são largamente utilizados e distribuídos no meio-ambiente e estão associados com um aumento da prevalência da doença (GORELL *et al.*, 2004).

TANNER (1992) demonstrou em estudos epidemiológicos em humanos, que há um aumento no risco de desenvolvimento da DP em residentes rurais expostos a herbicidas e pesticidas. Por outro lado, HERNAN *et al.*, (2002) demonstram que fumantes e bebedores de café estão inversamente associados com o risco de desenvolver a doença. Reforçando desta maneira o conceito de que fatores ambientais podem interferir na susceptibilidade do desenvolvimento da DP (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

Outra possibilidade para a causa, além das hipóteses genéticas e ambientais, é a neurodegeneração causada por toxinas endógenas, que podem ser originadas em virtude de erros em algumas vias metabólicas e que fatores, incluindo a inflamação, também estariam envolvidos na patogênese da doença (SAIRAM *et al.*, 2002).

1.4. Influência do processo inflamatório na Doença de Parkinson

A inflamação é a primeira linha de defesa do organismo contra injúrias teciduais ou infecções, no entanto, uma resposta inflamatória excessiva pode

tornar-se fonte de uma lesão tecidual ainda maior do que a provocada pelo estímulo inicial. Os neurônios, como resultado de uma grande diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma habilidade em se dividirem além de uma fraca capacidade de recuperação frente a lesões, tornam-se, portanto extremamente vulneráveis a processos auto-destrutivos, tais como os processos imune e inflamatório (GAO *et al.*, 2003). Diversas evidências dão suporte à existência de mecanismos relacionados à inflamação encefálica (neuroinflamação) em pacientes com DP. A etapa inicial dessa resposta ocorre pela ativação da população das células da glia, mais especificamente microglia. Outros tipos celulares como oligodendrócitos, que também compõem a população de células da glia no encéfalo, não são implicados neste tipo de ativação. A microglia, que por sua vez compõe o montante de células imunes residentes no encéfalo, é sensível às menores variações de fatores neurotóxicos, citocinas inflamatórias, radicais livres, aminoácidos excitatórios e proteases na SN, podendo tornar-se ativada durante a maioria das condições neuropatológicas como doença de Alzheimer, esclerose múltipla, AIDS, demência, traumas e DP (GAO *et al.*, 2003).

A ativação da microglia contribui para o aumento do dano neuronal, particularmente em doenças neurodegenerativas, onde a liberação de substâncias pró-inflamatórias e neurotoxinas acaba por potencializar a lesão (GAO *et al.*, 2002). As substâncias responsáveis por essa cadeia de eventos incluem citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), espécies reativas do oxigênio (ROS), eicosanóides e aminoácidos excitatórios.

No entanto muitos aspectos de uma inflamação são essenciais para o combate de uma doença. Diferentes populações de células da glia auxiliam na remoção de restos celulares, destruição de patógenos e liberação de fatores neurotróficos. Ou seja, a ativação da microglia pode fazer com que seja desempenhado um papel neuroprotetor através da promoção da sobrevivência neuronal, recuperação de neurônios lesados, eliminação de substâncias tóxicas e reparação tecidual (Figura 1).

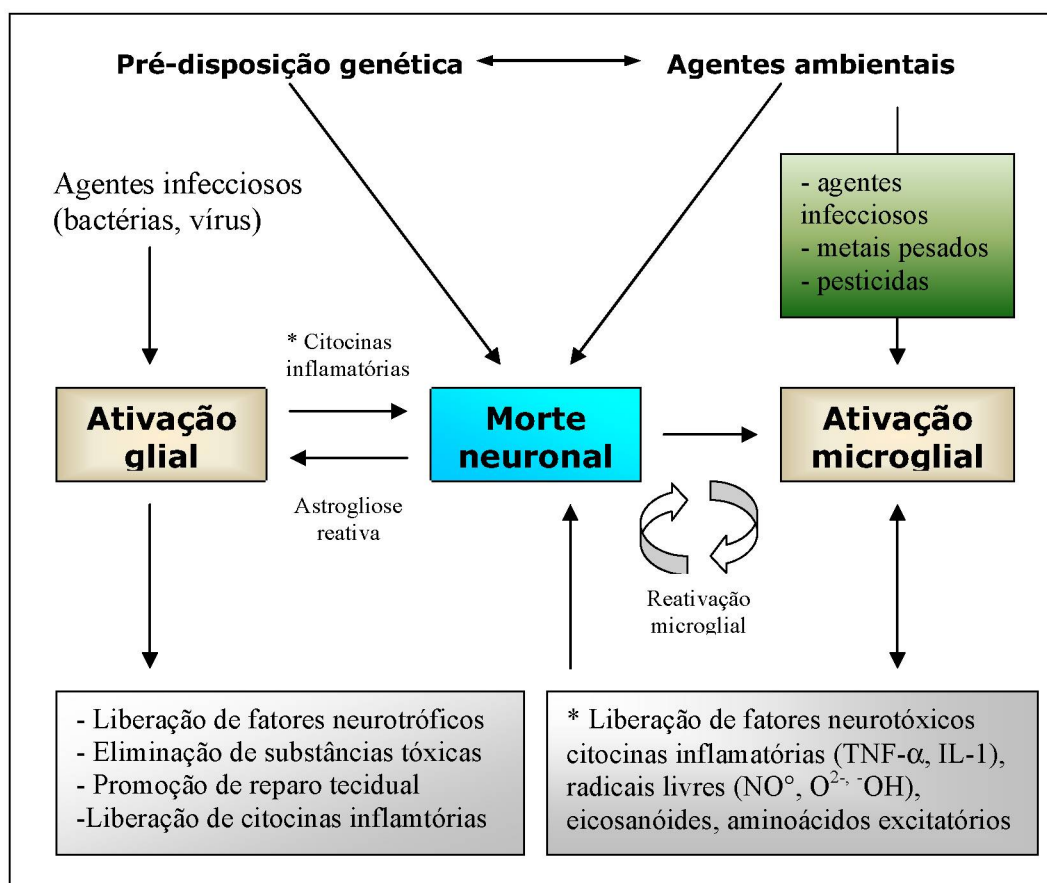


Figura 1: Neuroinflamação constitui-se como um componente responsável pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP. Notar o papel dual da glia, que por um lado pode ser benéfica ao tecido, e por outro, deletéria. (Adaptado de GAO *et al.*, 2003).

Agentes infecciosos tais como bactérias, vírus, lipopolissacarídeos (LPS), e toxinas ambientais (metais pesados e pesticidas) podem ativar diretamente a microglia. A microglia ativada libera uma gama de neurotoxinas que subsequentemente induzem inflamação e posterior morte celular neuronal. No entanto, acredita-se que uma pré-disposição genética, somada ou não a presença de neurotoxinas ambientais, disparariam processos que acarretam em lesões neuronais. A morte neuronal é uma consequência das lesões inflamatórias ou das

lesões neuronais diretas, que por sua vez também estimulam uma resposta inflamatória incluindo microgliose e astrogliose. A microgliose pode resultar em novos danos neuronais. A astrogliose pode exacerbar os danos devido à presença de citocinas pró-inflamatórias. Portanto o dano neuronal e a neuroinflamação amplificam-se mutuamente, formando um círculo vicioso (GAO *et al.*, 2003).

A DP, assim como seu modelo animal induzido por MPTP, possuem como característica a indução do aumento da expressão da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que por sua vez catalisa a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) (TEISMANN *et al.*, 2003).

De acordo com essa premissa, processos inflamatórios associados ao aumento da expressão de COX-2 e, portanto, níveis elevados de PGE₂, relacionam-se a eventos deletérios levando a neurodegeneração em várias condições patológicas (NOGAWA *et al.*, 1997; ALMER *et al.*, 2001; ANDREASSON *et al.*, 2001).

1.4.1. Características estruturais das enzimas COX-1 e COX-2

A enzima prostaglandina G₂/H₂ sintetase catalisa a conversão do ácido araquidônico em intermediários (prostaglandinas endoperóxidos) PGG₂ e PGH₂. Essa proteína bifuncional apresenta tanto atividade de ciclooxigenase (COX) quanto de hidroperoxidase (HOX), sendo coloquialmente chamada de ciclooxigenase (COX). Drogas como aspirina, um tradicional antiinflamatório não esteroide (AINE), inibem a atividade PGG₂/H₂ sintetases-1 e -2, similarmente, inibidores seletivos de COX-2 preferencialmente inibem a função PGG₂/H₂ sintetase-2 (Figura 2) (BAZAN, 2001).

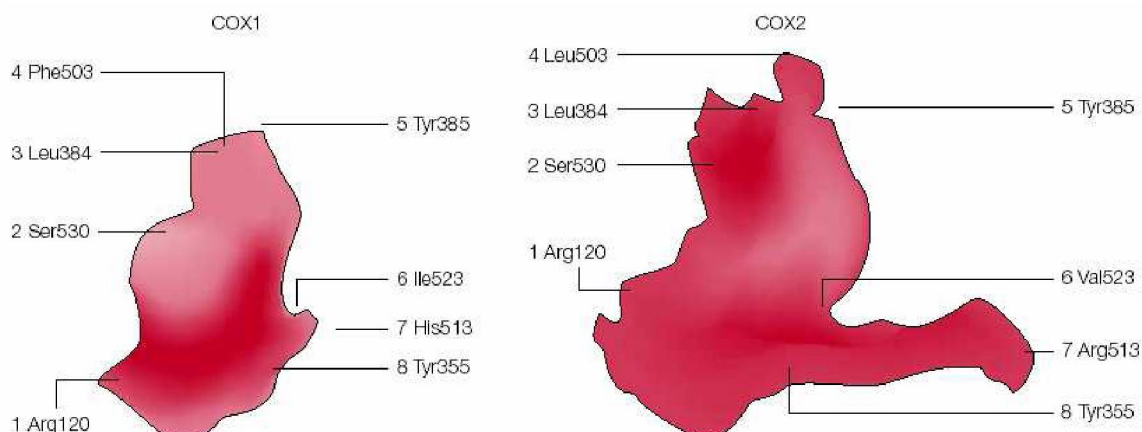


Figura 2: Diferenças estruturais entre as enzimas COX-1 e COX-2. A gravura da esquerda mostra um diagrama esquemático do sítio de ligação de AINES da COX-1. Uma região altamente conservada Arg120 e Tyr355 (1 e 8) estabiliza o grupo carboxilato que está presente na maioria dos AINES. O resíduo Tyr385 está próximo ao sítio peroxidase que forma um radical tirosil que é crucial para a introdução do oxigênio molecular no ácido araquidônico (substrato). A gravura da direita mostra o sítio de ligação da COX-2. Os resíduos altamente conservados (1 e 8) são mostrados como anteriormente. O resíduo 2 é constituído por Val523 na COX-2 que por sua vez permite uma ramificação na molécula. Essa ramificação pode acomodar grupos análogos aos inibidores da COX-2, que são estabilizados pela ligação ao hidrogênio ao resíduo 7 (Arg513). De maneira geral o espaço disponível na ramificação, presente na COX-2 é 25% maior que o sítio de ligação na COX-1 (Adaptado de: (BAZAN, 2001)).

1.4.2. COX-2 um modulador neuronal multifuncional.

Muitas questões permanecem obscuras a respeito do significado da COX-2 neuronal. Uma destas questões recai sobre onde estão as diferenças entre as formas fisiológica e patológica da enzima. Em contraste com a indução patológica da COX-2, que ocorre em diversos órgãos, no cérebro sua expressão acontece sob condições fisiológicas normais. Observa-se elevação dos níveis de COX-2 neuronal durante o desenvolvimento e remodelação da atividade sináptica. Ou seja, um aumento na quantidade dessa enzima pode ser visualizado em situações de maior atividade sináptica, porém não se sabe exatamente se esse aumento é um produto de uma superexpressão da enzima, ou se já há um transcrito pronto

para dar origem a uma maior quantidade do produto protéico então formado (Yamagata *et al.*, 1993). De fato, há uma elevação muito acima dos níveis normais de COX-2, que em situação normal se encontra praticamente fora do alcance de detecção de métodos convencionais, para atingir níveis extremamente elevados, o que é um forte indício a favor da hipótese de superexpressão (MARCHESELLI & BAZAN, 1996).

O tecido neuronal produz IL1- β em resposta a inflamações periféricas, no entanto, não está claro qual fator circulante realiza a comunicação entre a corrente circulatória e o sistema nervoso central (BAZAN, 2001).

A enzima COX converte o ácido araquidônico em PGH₂, este por sua vez é precursor de PGE₂ e de muitos outros prostanóides. Em células eucarióticas há duas principais isoformas dessa enzima, sendo que a COX-1 é expressa constitutivamente e a COX-2 é prontamente induzida em tecidos inflamados. No entanto ambas as isoformas da enzima sintetizam PGH₂, porém a COX-1 envolve-se primariamente na produção de prostanóides relevantes em processos fisiológicos, enquanto que a COX-2 é majoritariamente responsável pela produção de prostanóides ligados a eventos patológicos (O'BANNION, 1999).

A indução da expressão de COX-2 contribui para o processo neurodegenerativo na DP, haja vista que em análises *postmortem* de encéfalos de indivíduos portadores de DP, verificou-se a superexpressão de COX-2 especificamente nos núcleos da base. Corroborando a favor desse achado, verificou-se o mesmo tipo de indução em modelos animais que tiveram a SNpc lesada por MPTP (TEISMANN *et al.*, 2003). O resultado fisiológico ou patológico da ativação da COX-2 parece depender de seus níveis de expressão. Baixos níveis de expressão da enzima são produzidos durante o funcionamento normal das células, por outro lado, um aumento de expressão está associado a condições patológicas. Uma crise epiléptica causa um aumento de 10 vezes na expressão de COX-2, sendo que uma condição de *status epilepticus* induzida pelo ácido kaínico em modelos animais, resulta numa indução de 70 vezes da enzima no hipocampo (BAZAN, 2001).

Além disso, a inativação genética (nocaute) ou farmacológica da enzima óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) reduziu a toxicidade induzida por MPTP. Adicionalmente, a inativação de genes envolvidos na inflamação, como os que codificam para COX-2, NADPH oxidase e receptores para TNF- α , protege os neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxicidade induzida por MPTP, indicando que a inflamação é um importante componente dos processos neurodegenerativos causados por MPTP (GAO *et al.*, 2003). Ou seja, o significado de tais descobertas torna a DP uma doença de caráter multifatorial, possuidora de uma enorme versatilidade para desencadear processos lesivos às células nervosas, tanto neurônios quanto glia, resultando quase que invariavelmente na destruição de ambas. No entanto, ainda não podemos definir qual desses processos é o mais importante, ou então qual é o inicialmente ativado. Mais independente disso, sabemos com clareza que o processo neuroinflamatório é de suma importância na cadeia de eventos deletérios. Tal fato sugere que o uso de drogas antiinflamatórias seja útil na terapêutica, fato este que experimentalmente parece fazer sentido.

Evidências experimentais indicam que a inibição do processo inflamatório correlaciona-se com uma diminuição de lesões neuronais, fato este que suporta a idéia de que a inflamação possui um papel reforçador da neurodegeneração na DP (GAO *et al.*, 2003). Sugere-se que a inibição da COX-2 seja um valioso mecanismo para o desenvolvimento de novas terapias para DP, haja vista o papel central desta enzima em todo o processo inflamatório (TEISMANN *et al.*, 2003).

1.4.3. Cascatas regulatórias

Em teoria, ácidos graxos livres como o ácido araquidônico, podem ser formados a partir de diversas fontes, no entanto, o araquidonato ligado a fosfolipídio é provavelmente a fonte mais significativa. Fosfolipases, em especial a fosfolipase A₂ (cPLA₂) citossólica, são enzimas altamente reguladas pela via da MAP quinase (MAPK) que libera araquidonato, que por sua vez é transformado pelo complexo da ciclooxigenase (COX). O mecanismo desta reação é complexo

(2 mols de oxigênio molecular são introduzidos sequencialmente por uma reação da lipoxigenase, seguida pela reação da COX. Isto gera PGG_2 , uma 15-hidro-peróxido prostaglandina, que é reduzida a PGH_2 , o produto hidróxi correspondente. Estes intermediários apresentam pequena meia vida, e atividades biológicas independentes. No entanto, ainda não está claro até onde esta atividade independente é significativa in vivo. Uma bateria de enzimas transforma PGH_2 em uma variedade de produtos, alguns destes como o tromboxano sintetase (TX) e prostaciclina sintetase (PGI_2) apresentam marcada localização tecidual (ex: TX sintetase em plaquetas e PGI_2 sintetase no endotélio vascular) (FLOWER, 2003).

Os mediadores de maior destaque para o processo inflamatório são PGE_2 , devido a sua importância na gênese do processo, gerando febre e dor, PGI_2 devido a seu efeito inibidor da agregação plaquetária e possível ação na hiperalgesia e TXA_2 em virtude de sua importante atuação na agregação plaquetária.

1.4.4. A reação neuroinflamatória em pacientes parkinsonianos

O termo inflamação é genericamente usado para descrever um acúmulo local de fluidos, proteínas plasmáticas e células brancas do sangue, que é iniciado por uma lesão física, infecção ou reação imune local (HUNOT *et al.*, 2001). Enquanto que respostas inflamatórias agudas denotam um rápido e frequentemente transitório efeito, inflamações crônicas ocorrem quando há uma infecção persistente, ou durante uma resposta auto-imune. Em estágios mais avançados as vias efetoras imunológicas levam a inflamações crônicas, e posteriores lesões teciduais.

Como citado anteriormente, efeitos lesivos no SNC, como os mediados por respostas imunes, estão implicados na patogênese de doenças como a esclerose múltipla. Nesta doença, a ativação de células microgliais, produtoras de citocinas próinflamatórias (IFN- γ , TNF- α), por células T-CD4 infiltradas cronicamente está envolvida com a morte celular de oligodendrócitos e subsequente desmielinização de fibras nervosas, gerando os efeitos clínicos da doença (fraqueza muscular, dificuldade de movimentação, etc) (HUNOT *et al.*, 2001).

Na DP sugere-se que anormalidades imunológicas possibilitem a existência de um caráter auto-imune à doença. Diversos estudos têm apontado imunoglobulinas (Igs) reagindo com tecidos catecolaminérgicos, incluindo auto anticorpos contra neurônios dopaminérgicos no fluido cefalorraquidiano e plasma de pacientes portadores da DP (MCRAE-DEGUEURCE *et al.*, 1986). No entanto, os antígenos específicos para estas Igs ainda não se encontram claramente caracterizados (HUNOT *et al.*, 2001). Estudos com subgrupos de pacientes parkinsonianos (sete de vinte e um casos) mostraram que estes exibiram uma resposta específica com produção de IgG frente a proteínas dopamina-o-quinonas modificadas, também conhecidas como quinoproteínas. Esta resposta pareceu ser específica para a DP, pois não foi observada em pacientes com doença de Alzheimer ou esclerose lateral amiotrófica. De forma significativa, uma resposta similar foi observada em pacientes parkinsonianos que não foram tratados com L-DOPA, indicando que a reatividade não poderia ser em decorrência da terapia, e

sim um fenômeno associado com o mecanismo primário da patogênese (ROWE *et al.*, 1998).

As primeiras evidências da neuroinflamação reportaram um aumento significativo nos níveis de citocinas no estriado e fluido cefalorraquidiano de pacientes parkinsonianos comparados com indivíduos controle. Essas citocinas incluem TNF- α , IL1- β , IL-6, citocina associada à ativação de célula T (IL-2), citocinas antiinflamatórias (IL-4) e diversos fatores de crescimento. Este aumento nos níveis de citocinas, aparentemente, é específico para a via nigroestriatal não sendo observado em regiões corticais, sugerindo que a produção de citocinas é estritamente confinada à região da lesão (NAGATSU *et al.*, 2000). Entretanto, como a produção de citocinas no estriado não alcança a SN, onde os neurônios dopaminérgicos degeneram na DP, este dado dificilmente pode indicar como esta produção pode estar diretamente ligada à DP.

O que há de consenso é que as citocinas pró-inflamatórias são produzidas na vizinhança dos neurônios dopaminérgicos devendo estar implicadas na patogênese da doença (HUNOT *et al.*, 2001).

1.4.5. Antiinflamatórios

O processo neuroinflamatório é caracterizado como um importante fator que contribui ao processo neurodegenerativo crônico na DP, assim como em seus modelos animais (MPTP, MPP⁺, 6-OHDA (6-hidroxidopamina)). De fato, evidências experimentais demonstram que a inibição da resposta neuroinflamatória, com o uso de drogas antiinflamatórias, pode ser uma estratégia neuroprotetora, havendo atenuação da degeneração de neurônios dopaminérgicos, observada experimentalmente (GAO *et al.*, 2003).

O tratamento com drogas antiinflamatórias baseia-se na inibição da enzima COX-2, haja vista que o aumento de expressão desta enzima acarrete num recrudescimento dos processos deletérios aos neurônios (FERGER & TEISMANN, 2001). A dexametasona, um antiinflamatório esteroide (AIE), tem sido descrita com uma droga que possui atividade de inibir parcialmente a reação microglial,

levando a um decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (NO), o que resulta numa atenuação da lesão gerada por MPTP (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 1999) ou LPS (CASTANO *et al.*, 2002). No entanto há evidências contrárias ao possível efeito neuroprotetor supostamente conferido à dexametasona, no modelo animal do MPTP (AUBIN *et al.*, 1998). Uma eventual terapia a longo prazo, utilizando AIEs, tornar-se-ia limitada levando-se em conta os efeitos colaterais (principalmente imunossupressão) dessa classe de drogas. Tendo isso posto, o foco das possibilidades terapêuticas vira-se em direção aos AINEs, drogas estas que apresentam um bom potencial neuroprotetor, porém ainda a ser melhor explorado (GAO *et al.*, 2003).

Agentes inibidores não seletivos da enzima COX, como o salicilato de sódio, demonstraram atenuar significativamente a depleção dopaminérgica induzida por MPP⁺ em camundongos, sendo este um efeito independente de PGs, e sim associado a inativação de radicais hidroxil (SAIRAM *et al.*, 2003). Além disso, sugere-se que inibidores da COX-2 bloqueiam a degeneração do conteúdo de DA dos neurônios, induzida por MPTP (TEISMANN & FERGER, 2001) ou LPS (ARAKI *et al.*, 2001).

Entretanto nem todos estes efeitos neuroprotetores conferidos aos inibidores seletivos da COX-2 (p.e. rofecoxib, parecoxib) estão associados à diminuição da resposta neuroinflamatória, havendo também a existência de um efeito anti-oxidante, conferido a estes agentes (TEISMANN *et al.* 2003). Até o momento, não existem evidências clínicas dando suporte ao possível efeito neuroprotetor dessas drogas, ou seja, ainda não se considera o fato de incluir um antiinflamatório no leque de possibilidades terapêuticas disponíveis para o tratamento da DP. Em oposição a isso, há estudos epidemiológicos que sugerem a existência de uma correlação entre o uso de AINEs e a redução na incidência de casos da doença de Alzheimer (MCGEER & MCGEER, 2001).

1.5. Modelos animais da doença de Parkinson

Estudos *in vivo*, onde algumas das características relevantes da doença podem ser mimetizadas, fornecem informações cruciais sobre os mecanismos da doença e, além disso, proporcionam uma forma de avaliação de possíveis terapias a serem empregadas. Desta forma, os modelos animais da DP podem ser úteis tanto para o estudo da fisiopatologia como para a busca de novos tratamentos.

1.5.1 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

A neurotoxina MPTP foi descoberta em 1982 quando um grupo de dependentes de drogas desenvolveu um parkinsonismo severo. A síndrome foi causada por uma auto-administração de um análogo de heroína sintética, que por sua vez continha como contaminante o MPTP, sendo este altamente lipossolúvel, fato que lhe confere a grande capacidade de cruzar a barreira hemato-encefálica (LANGSTON, 1983; BALLARD, 1985). Uma vez no encéfalo, a pró-toxina MPTP é oxidada a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropirídium (MPDP⁺) pela MAO-B nas células da glia e em neurônios serotoninérgicos. Em seguida, o MPDP⁺ é convertido a MPP⁺ (provavelmente por oxidação espontânea), essa molécula então, através de um mecanismo desconhecido, atravessa o espaço extracelular. Como a molécula do MPP⁺ é polar, ela depende de carreadores de membrana plasmática para entrar nas células. O MPP⁺ é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT), bem como para o transportador de noradrenalina e serotonina (PRZEDBORSKI *et al*, 2001; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

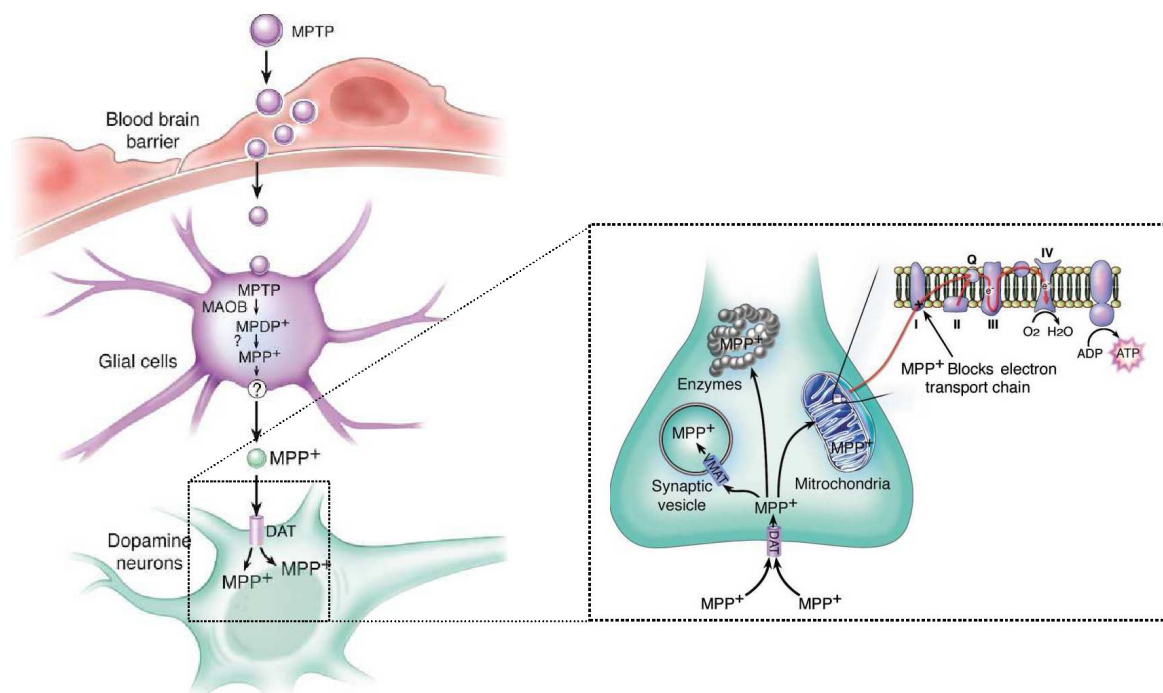


Figura 4: Representação esquemática do metabolismo do MPTP e das vias do MPP⁺ intracelular. Retirado de: (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

Dentro dos neurônios, o MPP⁺ pode seguir por três rotas (Figura 4): (1) Pode se ligar ao transportador vesicular da monoamina 2 (VMAT-2), que transporta o MPP⁺ para dentro das vesículas sinaptossomais; esse seqüestro do MPP⁺ ocorre para proteger as células da neurodegeneração induzida por MPTP, a toxina seqüestrada previne seu acesso à mitocôndria. (2) Pode se concentrar dentro da mitocôndria; quando isso ocorre, o MPP⁺ bloqueia o complexo I, que interrompe a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa perturbação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminui a síntese de adenosina trifosfato (ATP). (3) Pode permanecer no citossol, interagindo com enzimas citossólicas, especialmente as que são carregadas negativamente (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

Camundongos que apresentam ausência do transportador de DA foram protegidos da atividade neurotóxica do MPTP (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Uma vez absorvido o MPP⁺ concentra-se nas mitocôndrias onde possui a capacidade de inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, reduzindo assim a geração de ATP e causando a produção de ROS, induzindo a apoptose dos

neurônios dopaminérgicos (KITAMURA, 2000; SPECIALE, 2002; KITAMURA, 2003).

Ocorrem, de maneira geral, variações de suscetibilidade ao MPTP, sendo elas de caráter individual (de acordo com variações genéticas) ou referente à idade. Portanto, diferentes métodos de administração da mesma dose de MPTP, produzem diferentes resultados (GERLACH & RIEDERER, 1996).

1.5.2. 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

A 6-OHDA foi o primeiro agente usado num modelo animal de parkinsonismo. Aplicações de pequenas doses direto no ventrículo lateral (150 µg), ou em várias estruturas encefálicas (8 µg), levam a destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos (UNGERSTEDT, 1971). A maneira mais comum de utilização, desta neurotoxina, envolve a injeção unilateral de 6-OHDA diretamente na SN, haja vista que ela não atravessa a barreira hematoencefálica, levando a rápida morte celular similar ao modelo do MPTP. Dessa forma a lesão ocorre em decorrência da geração de radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, que presumivelmente inicia-se devido a um metal de transição, como o ferro. A confirmação do processo de formação de radicais livres, derivados do peróxido de hidrogênio, fica evidente experimentalmente com a infusão intranigral de Ferro (III) que por sua vez produz efeitos neurotóxicos similares aos produzidos pela 6-OHDA (BEN-SHACHAR & YODIM, 1991).

Demonstrou-se que ratos deficientes em ferro são resistentes à toxicidade da 6-OHDA (GLINKA *et al.*, 1996). Estes estudos sugerem que um aumento de ferro no encéfalo pode estar associado com a neurodegeneração da DP (KAUR & ANDERSEN, 2004).

Pode-se, também, injetar a 6-OHDA diretamente no estriado, causando assim uma degeneração retrógrada dos neurônios da SN. Isso gera uma lesão parcial que progride lentamente ao longo das semanas, fato este que simula o avanço progressivo da lesão na DP (BEAL, 2001). Devido à lesão, esses animais apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos a um forte

estresse ou com a aplicação de agonistas de receptores da dopamina (GERLACH & RIEDERER, 1996). Agonistas diretos, como apomorfina, provocam rotações contra-laterais, enquanto que agonistas indiretos, tais como a anfetamina, que induz a liberação de catecolaminas, produzem rotações ipsilaterais (GERLACH & RIEDERER, 1996). Esse comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Ou seja, as drogas agonistas terão seu efeito potencializado pela supersensibilização dos receptores (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Esses achados experimentais com 6-OHDA foram descritos em ratos, no entanto, outras espécies de roedores e de não roedores como macacos apresentam o mesmo comportamento mediante exposição a esta neurotoxina (GERLACH e RIEDERER, 1996).

Além da degeneração dopaminérgica causada pela neurotoxicidade da 6-OHDA, essa toxina também gera uma resposta microglial associada à via nigroestriatal (CICCHETTI, *et al.*, 2002). Elevados níveis de TNF- α foram observados tanto no estriado quanto na SN de ratos injetados com 6-OHDA (MOGI *et al.*, 1999). As maiores vantagens do uso desse modelo animal são para a quantificação de déficit motor e a avaliação de efeitos antiparkinsonianos de novas drogas (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Ademais, também foi demonstrado que ratos lesionados com 6-OHDA apresentaram prejuízos de memória (FERRO *et al.*, 2005), demonstrando também que o modelo produz alterações cognitivas em animais.

1.5.3. Lipopolissacarídeo (LPS)

LPS é o imunoestimulante ativo presente na parede celular de bactérias gram-negativas, sendo responsável por iniciar a cascata de eventos seguintes à infecção bacteriana (HOLST *et al.*, 1996), incluindo a produção de citocinas (MATHISON *et al.*, 1988). Estudos anteriores demonstraram que a infusão intranigral de LPS foi capaz de reduzir significativamente os níveis estriatais de DA, além de gerar morte em neurônios dopaminérgicos (CASTAÑO *et al.*, 1998). Outros trabalhos verificaram uma maior suscetibilidade dos neurônios da SNpc frente a neurotoxicidade do LPS, em detrimento de neurônios de outras regiões encefálicas (HERRERA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2000). Dessa forma é possível afirmar que o LPS pode ser considerado um modelo animal da DP, pois mimetiza aspectos fisiopatológicos inerentes à doença, além de propiciar um ambiente de níveis crescentes de estresse oxidativo aos neurônios, que por sua vez é um fenômeno presente na doença.

Neste estudo utilizamos modelos animais que potencialmente devam induzir o processo neuroinflamatório, para isso os modelos escolhidos foram: LPS, MPTP e 6-OHDA. Os dois últimos estão bem estabelecidos na literatura como bons modelos comportamentais da DP. No entanto não se sabe ao certo se estes modelos mimetizam adequadamente o processo neuroinflamatório, e se este é por si só capaz de levar a uma alteração motora. Para tanto utilizamos o LPS como um controle positivo para o processo neuroinflamatório. Além disso, apesar de alguns dados presentes na literatura, não há consenso quanto o papel do LPS como um possível modelo comportamental para a DP.

Deste modo, o presente estudo pretende investigar a possível correlação entre modelos animais de parkinsonismo e o aumento da expressão da COX-2 na SN e no estriado de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a influência do processo inflamatório em modelos animais de parkinsonismo induzidos por infusão intranigral de MPTP, 6-OHDA e LPS.

2.2. Objetivos específicos

- ➔ Verificar os efeitos da administração intranigral de MPTP, 6-OHDA e LPS na atividade geral de ratos, utilizando o campo aberto.
- ➔ Determinar o perfil de expressão, em diferentes tempos de observação, da proteína COX-2 na SN e estriado de ratos tratados com as neurotoxinas MPTP, 6-OHDA e LPS.
- ➔ Determinar a existência ou ausência de uma relação entre o perfil de expressão de COX-2, com os efeitos produzidos pelas neurotoxinas na atividade geral.
- ➔ Verificar os efeitos da administração intraperitoneal de antiinflamatórios esteroidais (indometacina e piroxicam) na atividade geral de ratos tratados com MPTP intranigral.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, da mesma linhagem, obtidos através de cruzamentos sucessivos de matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os animais são mantidos em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de claro-escuro de 12h (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos.

3.2. Drogas

- ➔ Solução salina (NaCl 0,9%) estéril;
- ➔ MPTP (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma Chemical Co., EUA), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) estéril;
- ➔ 6-OHDA (6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma Chemical Co., EUA), dissolvido em líquido céfalo raquidiano (LCR) estéril;
- ➔ LPS (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *Escherichia coli*, serotype 0111:B4 Sigma Chemical Co., EUA), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) estéril;
- ➔ Indometacina (Sigma Chemical Co., EUA), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) estéril;

3.3. Cirurgia Estereotáxica

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica foram inicialmente anestesiados com Equitesin (0,3mg/kg – i.p.). Após a anestesia administrou-se 0,10 mL de penicilina G-procaína (20.000 U/0,05 mL – i.m.), sulfato de atropina (0,4 mg/kg – i.p.) e o anestésico local (lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor – s.c.) na derme que recobre o crânio dos ratos.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica (estereotáxico - David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral de MPTP, 6-OHDA ou LPS diretamente na SN. Para a cirurgia foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: antero-posterior (AP): 5.0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML): ± 2.1 mm a partir da linha média e dorso-ventral (DV): -7.7 mm a partir da calota craniana e foram injetados um volume de 1 μ l de neurotoxina utilizando-se um fluxo de 0,33 μ l/min.

A microinfusão de neurotoxina foi realizada com auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro-seringa de 10 μ L (Hamilton, EUA) que por sua vez, foi encaixada em uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). Após o término da microinfusão a agulha foi mantida no local por mais 2 minutos para evitar refluxo da neurotoxina. Em seguida, o escalpo foi suturado e os animais retirados do estereotáxico. Os ratos então foram colocados em suas gaiolas de contenção.

Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico. No entanto, os animais não receberam a neurotoxina, sendo somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas. Os ratos do grupo controle não foram submetidos à cirurgia estereotáxica, mas foram retirados da gaiola de moradia para manuseio durante alguns minutos. Os animais operados com as diferentes neurotoxinas apresentaram boa recuperação pós-cirúrgica, não havendo sido observado mortalidade estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

3.4. Tratamento farmacológico

O AINE indometacina foi administrado 1h antes da cirurgia estereotáxica na dose de 10 mg/kg e em intervalos de 24h na dose de 1 mg/kg, perfazendo 7 dias de tratamento.

3.5. Observações comportamentais

3.5.1. Campo aberto

O campo aberto é um aparelho que consiste em uma arena de metal circular com 97 centímetros de diâmetro e 32,5 centímetros de altura, pintada de branco, com o chão dividido por linhas pretas em um círculo central e trapézios ao redor deste, somando um total de 19 unidades. O campo aberto foi construído de acordo com a descrição de BROADHURST, (1960).



Figura 5: Campo aberto.

Os animais foram submetidos a este teste após a cirurgia, os grupos controles foram submetidos ao teste nas mesmas condições. Os animais foram colocados no círculo central do campo aberto e seu comportamento foi avaliado durante 5 minutos. Essa avaliação inclui quantificar os parâmetros de frequência de locomoção, frequência de levantar, duração de imobilidade e tempo de latência para o início do movimento. Cada animal foi avaliado individualmente sendo que o aparelho foi limpo entre um animal e outro com solução de etanol 5%.

3.6. Ensaios bioquímicos

3.6.1. Extração de proteínas

Foram utilizados três animais por grupo para cada tempo analisado sendo eles 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 3 e 7 dias após cirurgia esterotáxica. Após a decapitação os encéfalos foram dissecados rapidamente para a retirada bilateral da SN e estriado. Estas estruturas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, evitando assim a degradação de seus conteúdos protéicos. Após isso, os tecidos isolados foram homogeneizado por sonicação em tampão de lise gelado (pH 7,4) contendo 50 mM de Tris-HCl, 120 mM de NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,25% deoxicolato de sódio, 0,25% de DTT, 20 μ M de PMSF e tablete completo de inibidor de proteases (Roche). O extrato foi então centrifugado a 10.000 x g, 4°C por 20 minutos.

O sobrenadante corresponde ao extrato protéico total que por sua vez foi pipetado e congelado a -80°C em alíquotas para posterior dosagem.

3.6.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas no extrato foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951). A dosagem de proteínas foi realizado após lise do tecido (item 3.6.1). Uma solução de soro albumina bovina (1 mg/mL) foi utilizada como padrão.

3.6.3. Precipitação de proteínas

Devido às baixas concentrações de proteínas totais obtidas, em virtude da pequena massa de tecido utilizada nos ensaios, resolveu-se aplicar uma técnica de precipitação de proteínas que empregou o ácido tricloroacético (TCA) a 10% (The QIA expressionist., 2003). Nesse protocolo adicionou-se TCA 10% 1:1 em relação às alíquotas das amostras de extrato protéico. As proteínas, mediante

baixa temperatura (4°C) precipitaram por 10 minutos. Após isso, centrifugou-se as amostras a 10.000 x g, 4°C por 5 minutos, havendo formação de *pellets* de proteínas. Esses *pellets* foram lavados por 2 vezes em acetona gelada, novamente centrifugados nas mesmas condições e, então, a acetona foi descartada, restando apenas os *pellets* que então foram secos ao ar e ressuspensos em tampão de amostra 5 x. As amostras foram então sonicadas por 10 segundos (em gelo) e em seguida fervidas por 10 minutos para uma completa desnaturação das proteínas. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos e aplicou-se o sobrenadante no gel de poliacrilamida-SDS a 10%.

3.6.4. Western blotting

Para o experimento de imunodeteção (western blotting), foi utilizada metodologia padrão conforme descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989. De forma breve, será descrito a seguir: amostras de 50 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, as quais foram reagidas com anticorpos específicos contra COX-1 (1:100 sc-1754, Santa Cruz Biotechnology) e COX-2 (1:500 sc-1747, Santa Cruz Biotechnology), e a seguir com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (donkey anti-goat IgG HRP 1:1000 sc-2033, Santa Cruz Biotechnology). A visualização foi realizada com o sistema de quimioluminescência (ECL, Santa Cruz Biotechnology).

3.7. Análise densitométrica

Utilizou-se filmes de raios-X Kodak T-MAT, revelador e fixador Kodak em concentrações apropriadas. Após a revelação e secagem dos filmes, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do *software ImageJ* versão 1.32j <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade ótica para a região delimitada pelo operador. Esta região

deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando passa-se a analisar uma outra banda. O valor final de intensidade relativa pode ser expresso de forma absoluta ou como razão, quando comparada com a intensidade relativa de outras bandas.

3.8. Análise estatística

Para avaliar a atividade geral dos animais (campo aberto) foi utilizado a ANOVA de Kruskal-Wallis. Para avaliar os ensaios de western blotting foi utilizado ANOVA de uma via e quando esta mostra diferença significativa fez-se comparações pareadas entre as médias utilizando teste post hoc de Newman-Keuls. Considerou-se o nível de significância de 0,05 para que se rejeite a hipótese de nulidade. O *software* INSTAT versão 3.06 (2003) foi empregado para efetuar todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. Comparação entre modelos animais: LPS, MPTP e 6-OHDA.

4.1.1. Análise comportamental (campo aberto).

A figura 6 apresenta os dados referentes à comparação comportamental entre os modelos animais de parkinsonismo, MPTP, 6-OHDA e LPS, frente ao parâmetro de latência medido 24 h, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica. A ANOVA de uma via mostrou que o grupo 6-OHDA apresentou tempo de latência aumentado em comparação a todos os demais grupos nos três dias testados ($P < 0,001$).

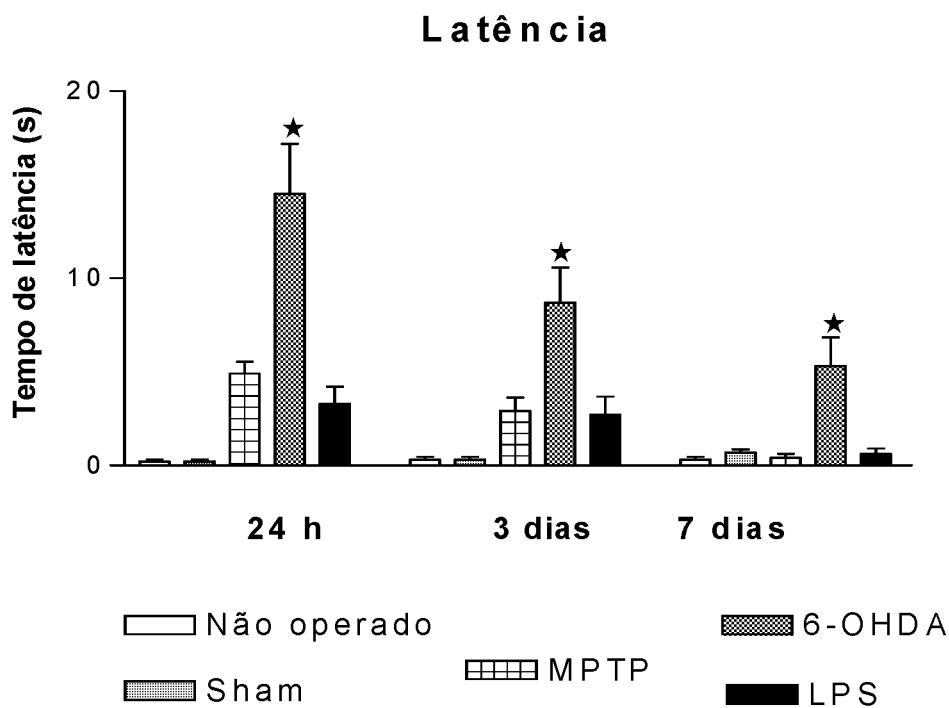


Figura 6: Comparação entre os tempos de latência de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS. Os animais foram tratados com MPTP 100µg/µL, 6-OHDA 6 µg/µL e LPS 2 µg/µL e analisados em campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam à média ± S.E.M. ($n = 10$ por grupo). ★ $P < 0,001$ comparado ao grupo controle não operado. Utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey.

A figura 7 ilustra os dados referentes à comparação comportamental entre os modelos animais de parkinsonismo, MPTP, 6-OHDA e LPS, frente ao parâmetro de locomoção medido 24 h, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica. A ANOVA mostrou que 24 h após houve redução significativa ($P<0,05$), no parâmetro de locomoção, dos grupos MPTP e 6-OHDA em comparação aos grupos não operado e sham. Já três dias após houve uma recuperação motora por parte dos grupos MPTP e 6-OHDA. No sétimo dia o grupo MPTP apresentava hiperlocomoção, em comparação ao grupo não operado ($P<0,05$), de maneira semelhante ao grupo LPS que já apresentava hiperlocomoção no terceiro dia, em comparação aos grupos: não operado, sham e 6-OHDA ($P<0,05$).

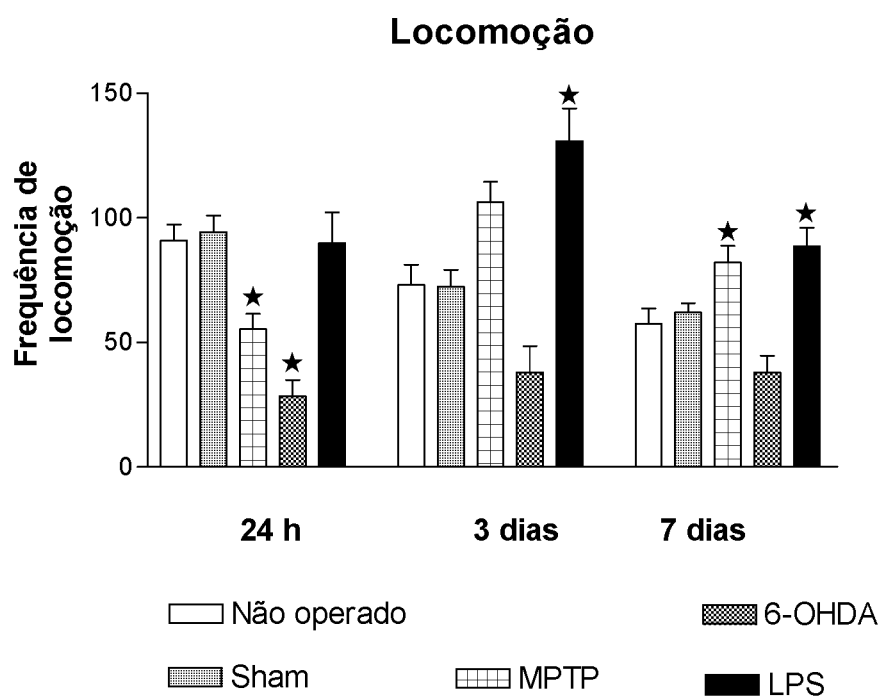


Figura 7: Comparação entre as freqüências de locomoção de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS. Os animais foram tratados com MPTP 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 6-OHDA 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e LPS 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e analisados em campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média \pm S.E.M. ($n = 10$ por grupo). ★ $P<0,05$ comparado ao grupo controle não operado. Utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey.

A figura 8 mostra os dados referentes à comparação comportamental entre os modelos animais de parkinsonismo, MPTP, 6-OHDA e LPS, frente ao parâmetro de frequência de levantar, medido 24 h, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica. A ANOVA mostrou que o grupo 6-OHDA apresentou redução significativa ($P<0,01$), no parâmetro de frequência de levantar, em comparação ao grupo não operado nos três dias testados.

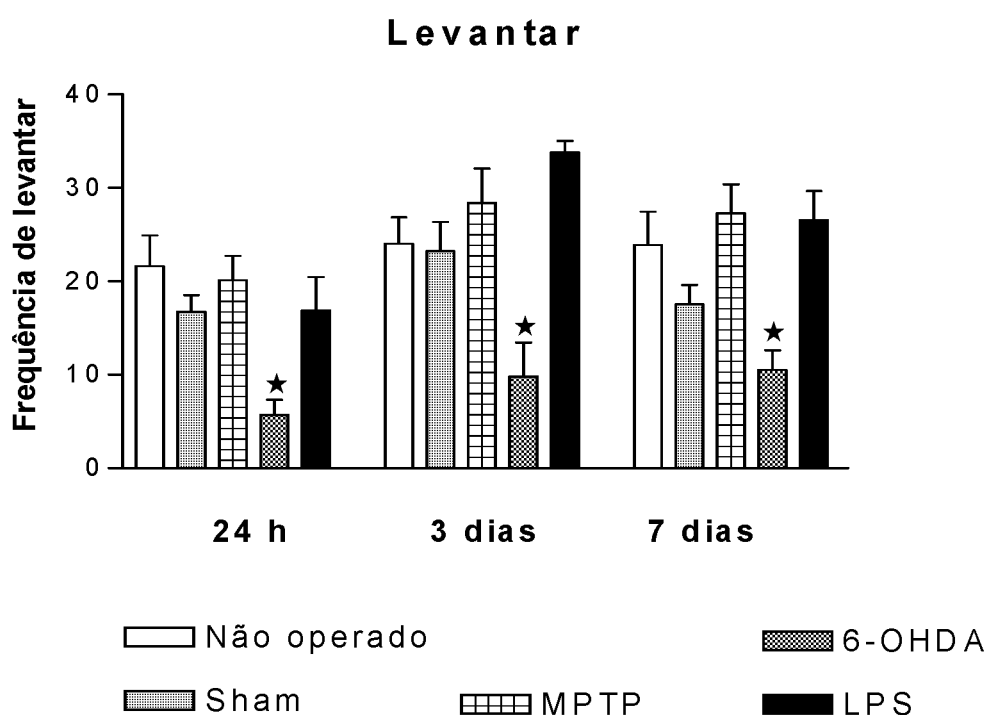


Figura 8: Comparação entre as frequências de levantar de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS. Os animais foram tratados com MPTP 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 6-OHDA 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e LPS 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e analisados em campo aberto 24 h, 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam à média \pm S.E.M. ($n = 10$ por grupo). ★ $P<0,01$ comparado ao grupo controle não operado. Utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey.

A figura 9 mostra os dados referentes à comparação comportamental entre os modelos animais de parkinsonismo, MPTP, 6-OHDA e LPS, frente ao parâmetro de tempo de imobilidade medido 24 h, 3 e 7 dias após cirurgia estereotáxica. A ANOVA mostrou que o grupo 6-OHDA apresentou aumento significativo ($P < 0,001$) do tempo de imobilidade em comparação aos demais grupos nos tempos de 24 h e 3 dias após a cirurgia estereotáxica.

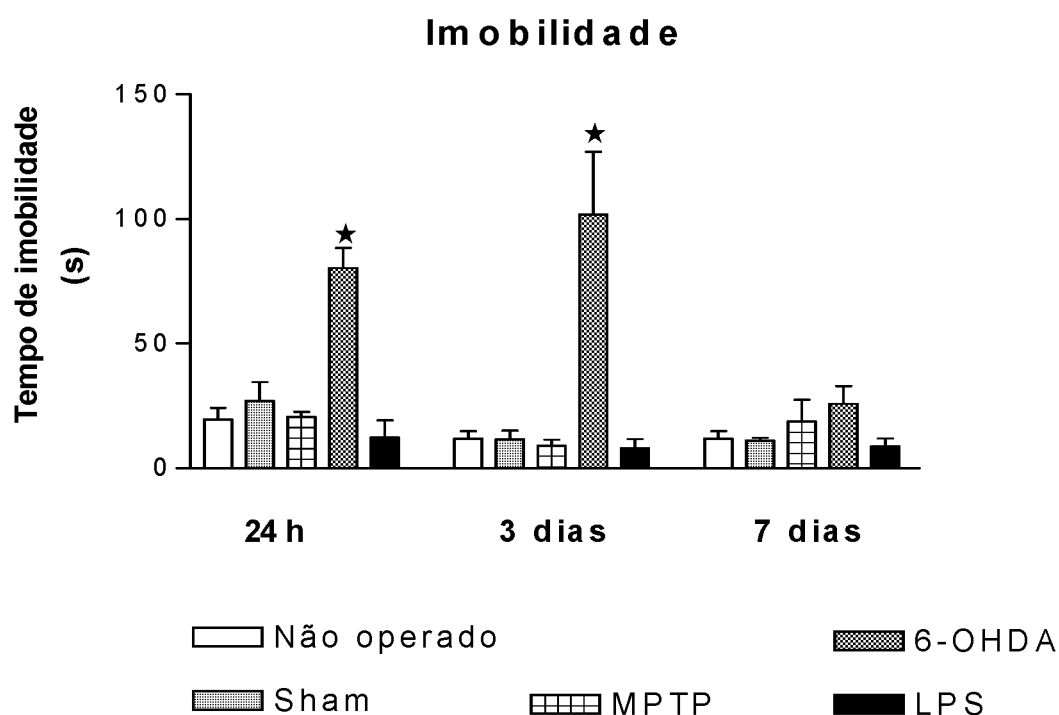


Figura 9: Comparação entre os tempos de imobilidade de grupos lesados por MPTP, 6-OHDA e LPS. Os animais foram tratados com MPTP 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 6-OHDA 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e LPS 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e analisados em campo aberto 24h, 3 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam à média \pm S.E.M. ($n = 10$ por grupo). ★ $P < 0,001$ comparado ao grupo controle não operado. Utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey.

4.1.2. Perfil de expressão de COX-2 induzida por LPS, MPTP e 6-OHDA.

A figura 10 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 na SN após o procedimento cirúrgico Sham, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Não verificou-se indução aumentada da expressão de COX-2 na SN, em nenhum dos tempo observados.

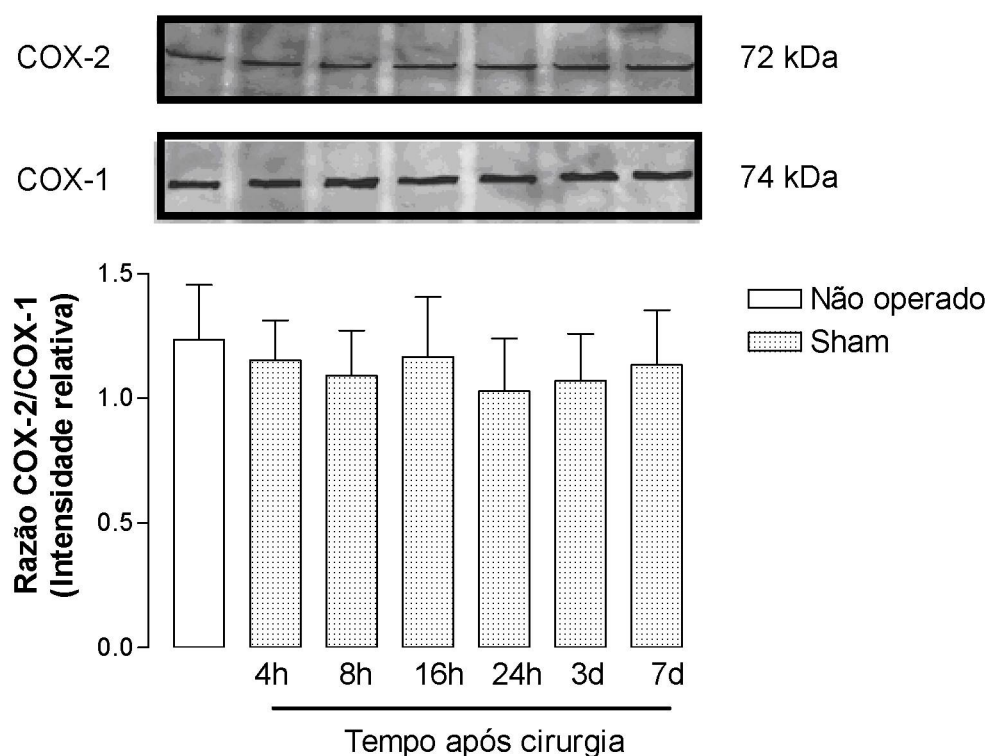


Figura 10: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após procedimento Sham. A. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada grupo de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

A figura 11 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 no estriado após o procedimento cirúrgico Sham, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Não verificou-se indução aumentada da expressão de COX-2 no estriado, em nenhum dos tempos observados.

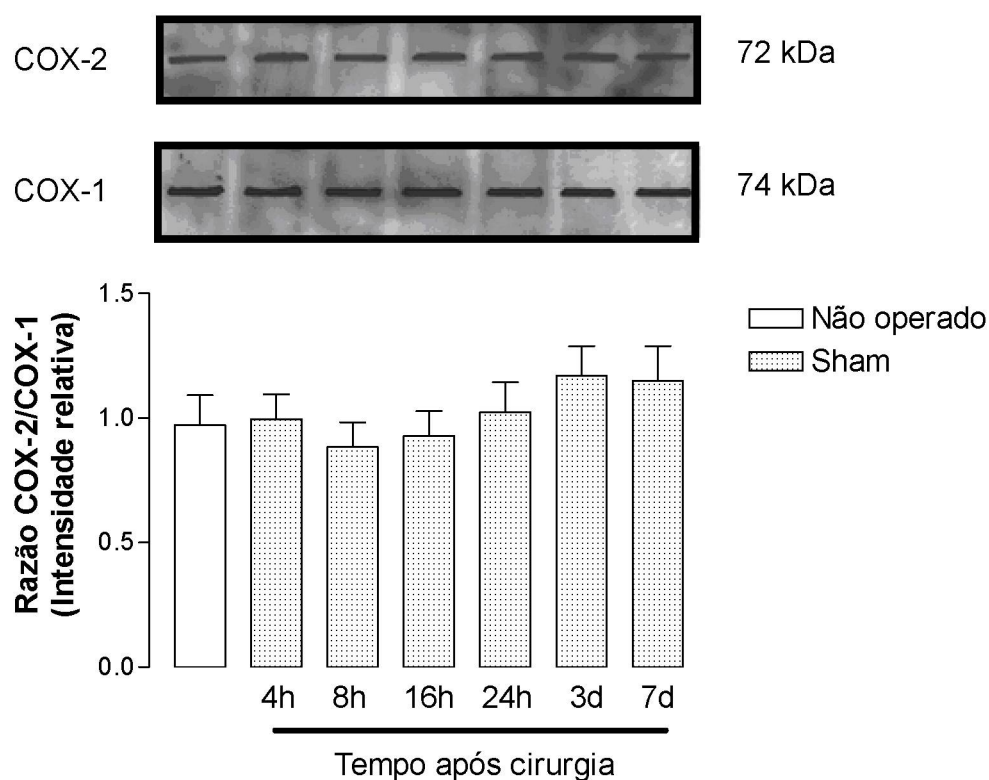


Figura 11: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após procedimento Sham. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

A figura 12 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 na SN após o procedimento infusão intranigral de LPS, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Observou-se aumento significativo na indução de COX-2 na SN ($P<0.01$) 8h e ($P<0.05$) 16h após a infusão intranigral de LPS.

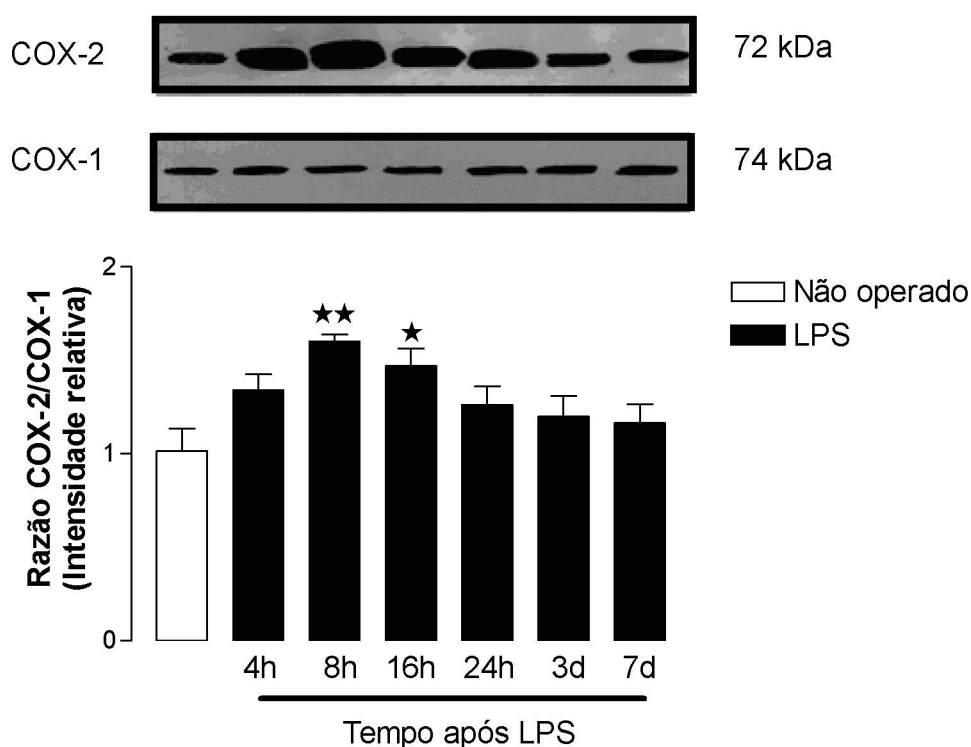


Figura 12: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de LPS. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. ★ $P<0.05$ comparado ao grupo não-operado; ★★ $P<0.01$ comparado ao grupo não-operado. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls.

A figura 13 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 no estriado, após o procedimento infusão intranigral de LPS, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Não detectou-se nenhuma diferença significativa na expressão de COX-2 no estriado ao longo do tempo de observação.

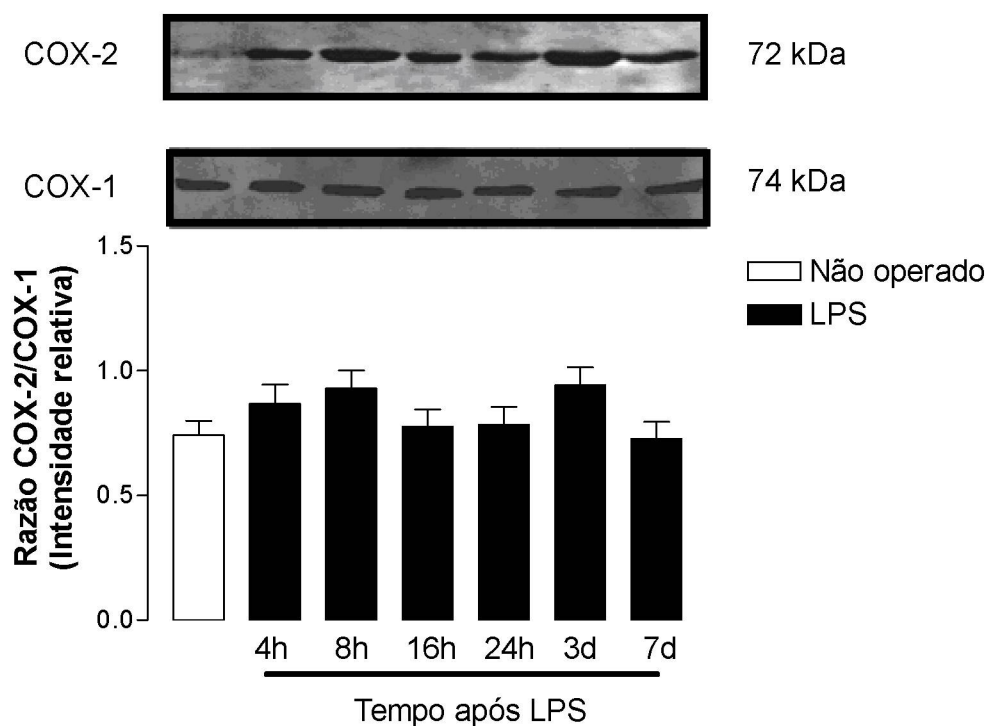


Figura 13: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de LPS. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

A figura 14 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 na SN, após o procedimento infusão intranigral de MPTP, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Verificou-se aumento significativo ($P<0.05$) na indução de COX-2, na SN, 16 h após infusão intranigral de MPTP.

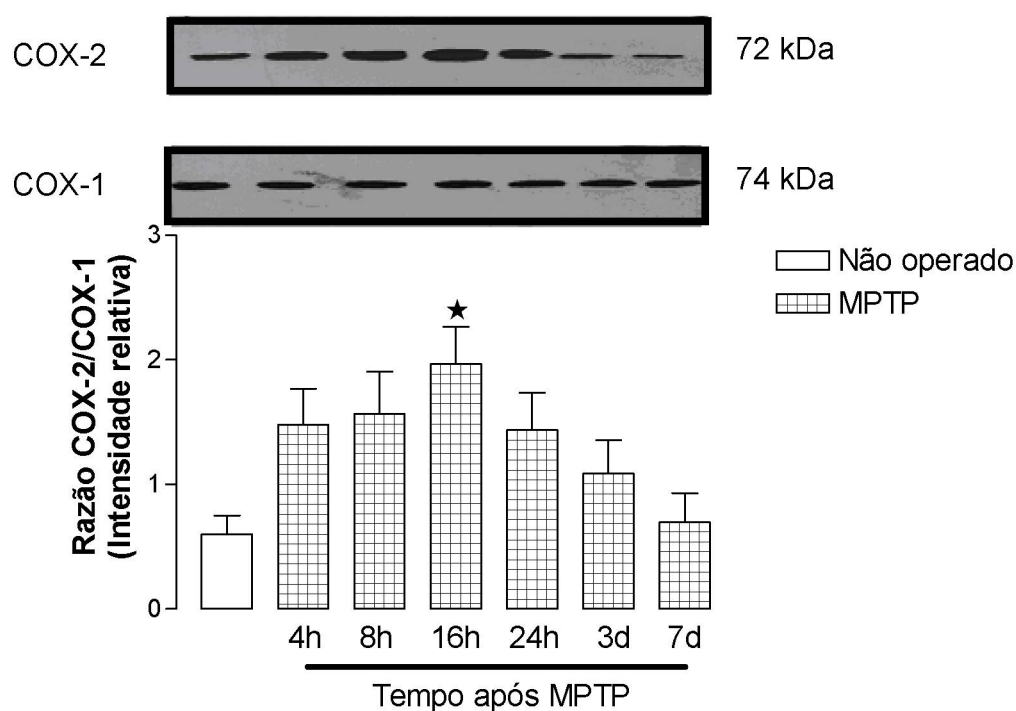


Figura 14: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de MPTP. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. ★ $P<0.05$ comparado ao grupo não-operado. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls.

A figura 15 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 no estriado, após o procedimento infusão intranigral de MPTP, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Não detectou-se nenhuma diferença significativa na expressão de COX-2 no estriado, ao longo dos tempos de observação

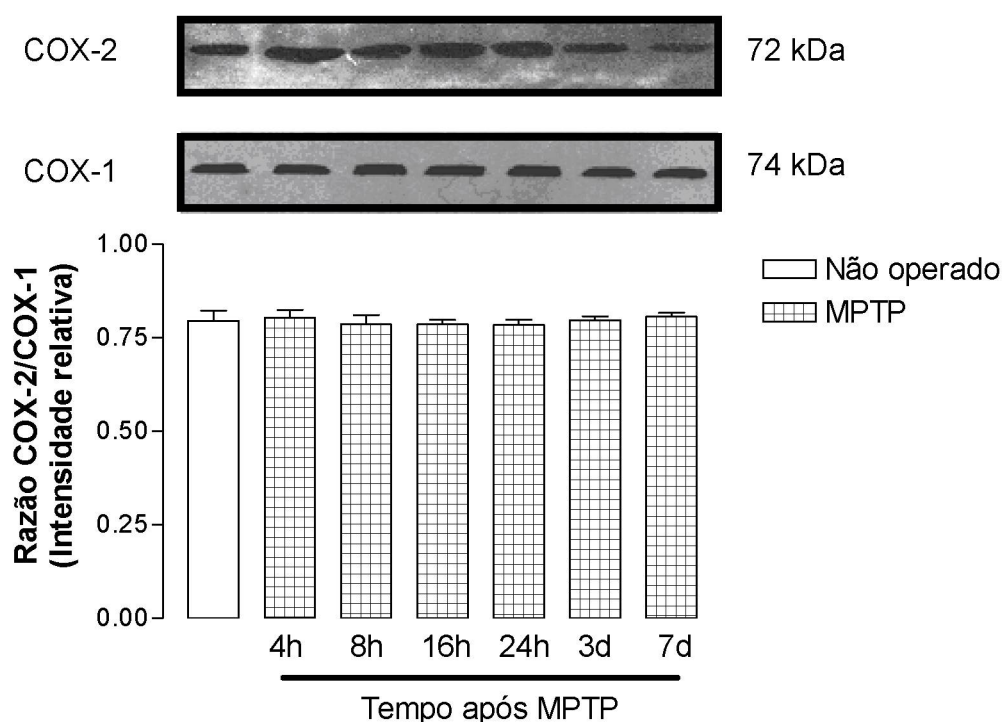


Figura 15: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de MPTP. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

A figura 16 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 na SN e estriado, após o procedimento infusão intranigral de 6-OHDA, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Verificou-se aumento significativo na indução de COX-2 na SN, 4 ($P<0.001$), 8 ($P<0.001$), 16 ($P<0.001$) e 24h ($P<0.01$) após infusão intranigral de 6-OHDA.

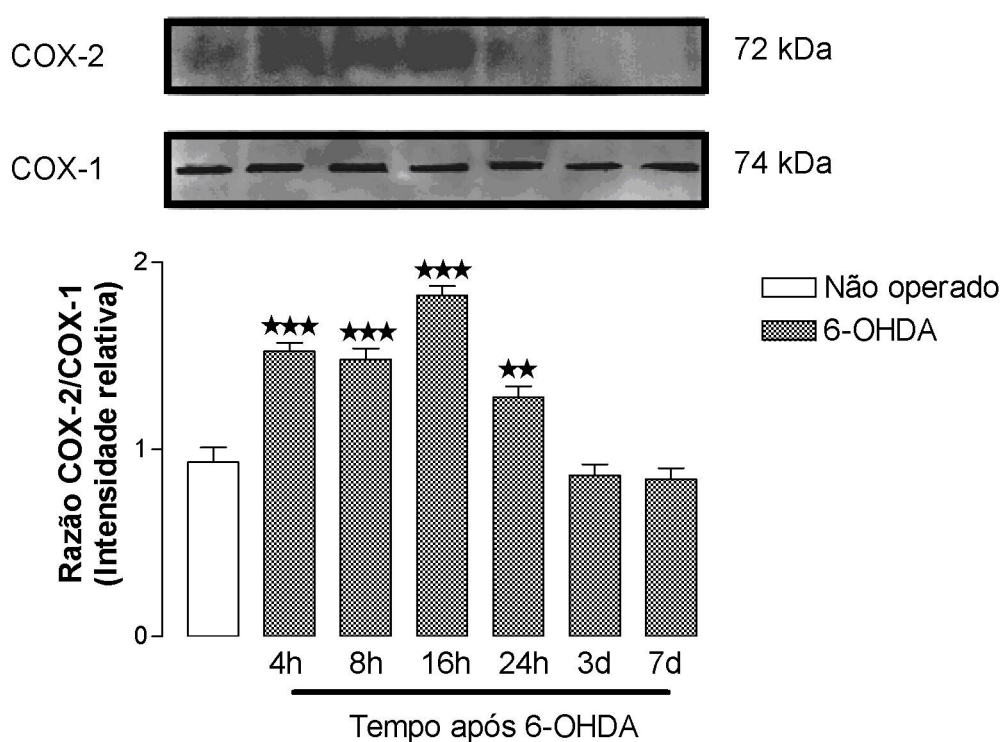


Figura 16: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 na SN após infusão de 6-OHDA. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. ★ $P<0.05$ comparado ao grupo não-operado; ★★ $P<0.01$ comparado ao grupo não-operado; ★★★ $P<0.001$ comparado ao grupo não-operado. ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls.

A figura 17 apresenta a análise da expressão da proteína COX-2 no estriado, após o procedimento infusão intranigral de 6-OHDA, ao longo dos tempos observados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias, são a razão da densidade ótica das bandas da COX-2 pelos valores de densidade ótica das bandas da COX-1. Não detectou-se nenhuma diferença significativa na expressão de COX-2 no estriado, ao longo dos tempos de observação.

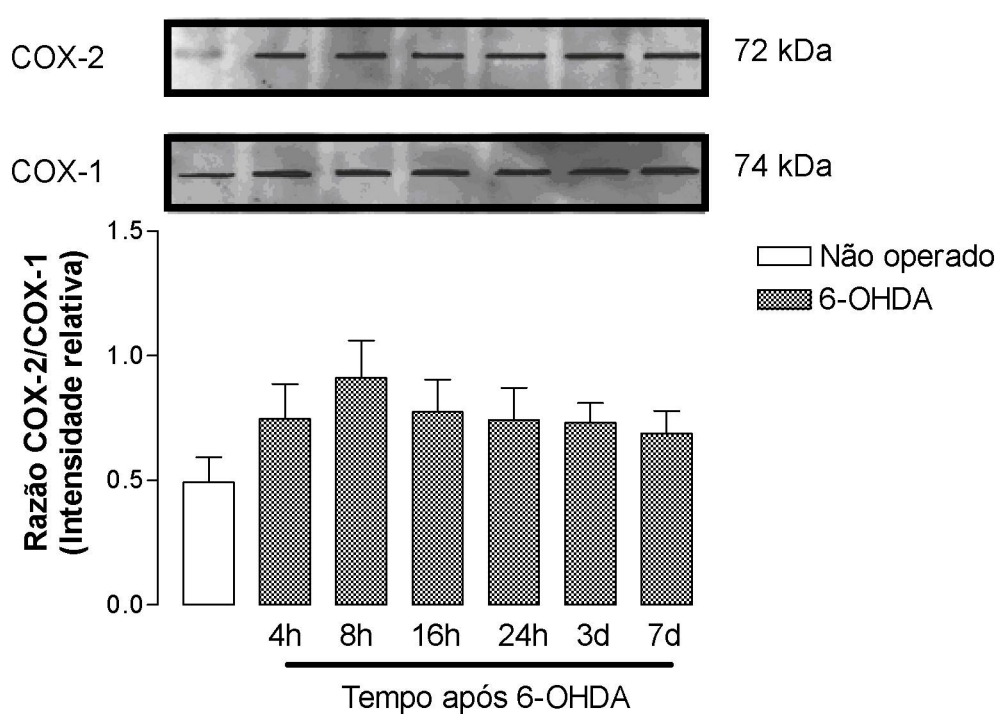


Figura 17: Detecção por western blotting da expressão de COX-2 e COX-1 no estriado após infusão de 6-OHDA. Os extratos celulares dos tecidos analisados foram preparados de acordo com os tempos indicados. Os valores representam média \pm S.E.M. utilizando-se 3 animais para cada tempo de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

4.1.3. Tratamento com indometacina dos animais lesados por MPTP

A figura 18 apresenta os dados referentes ao parâmetro de tempo de latência para o início dos movimentos, 24 horas e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. A ANOVA de uma via mostrou que 24 h após a cirurgia os grupos Sham + salina, Sham + IND e MPTP + salina apresentaram seus tempos de latência aumentados ($P < 0,05$) em comparação ao controle + salina, sendo que o grupo MPTP + IND não apresentou diferença estatística, quando comparado ao grupo controle + salina. No sétimo dia apenas o grupo MPTP + salina não apresenta diferença estatística em comparação aos demais grupos, embora não seja diferente do grupo controle + salina.

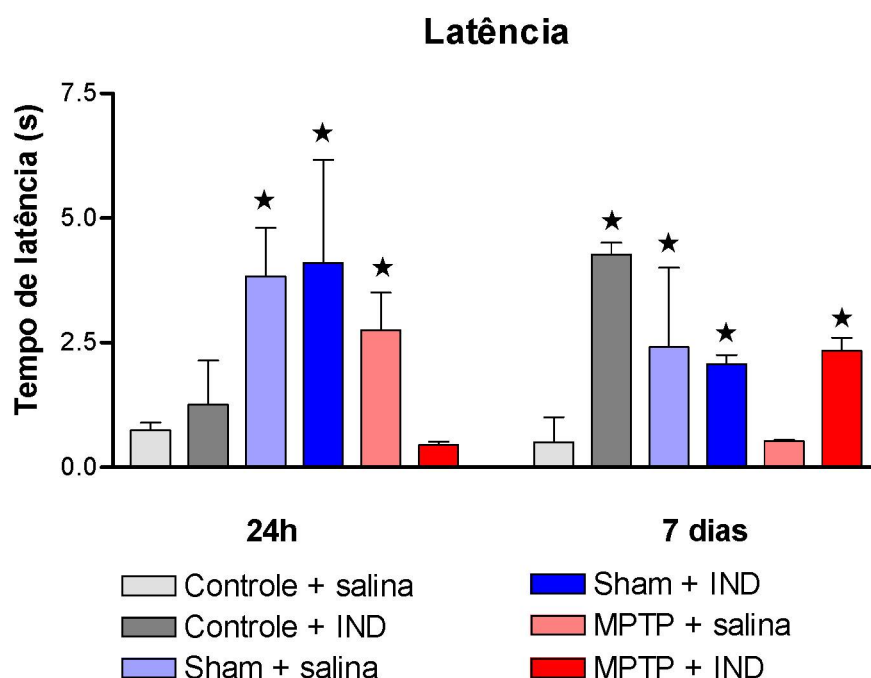


Figura 18: Efeitos da administração de IND no tempo de latência de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto. Os animais foram tratados com IND (10 mg/kg) 1 hora antes da cirurgia estereotáxica. O teste de campo aberto foi realizado 24 horas e 7 dias após a cirurgia, sendo que nesse período os animais foram tratados com IND (1 mg/kg) uma vez ao dia. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 10$ por grupo). ★ $P < 0.05$ comparado ao grupo controle + salina. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

A figura 19 mostra os dados referentes à administração de IND no modelo do MPTP. A avaliação do parâmetro de frequência de locomoção foi feita 24 horas e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. A ANOVA de uma via mostrou que o grupo MPTP + salina apresentou hipolocomoção em comparação aos grupos controle + salina, controle + IND, sham + salina, sham + IND ($P<0,05$), e que o grupo MPTP + IND apresentou aumento significativo na frequência de locomoção ($P<0,05$), frente ao grupo MPTP + salina e que esta locomoção não foi diferente dos demais grupos.

No sétimo dia todos os grupos que receberam IND, incluindo os controles, apresentaram redução significativa de ambulação ($P<0,001$), em comparação ao grupo controle + salina. Também observou-se redução significativa ($P<0,05$) da frequência de locomoção do grupo MPTP + IND no sétimo dia em comparação ao mesmo grupo 24 horas após a cirurgia.

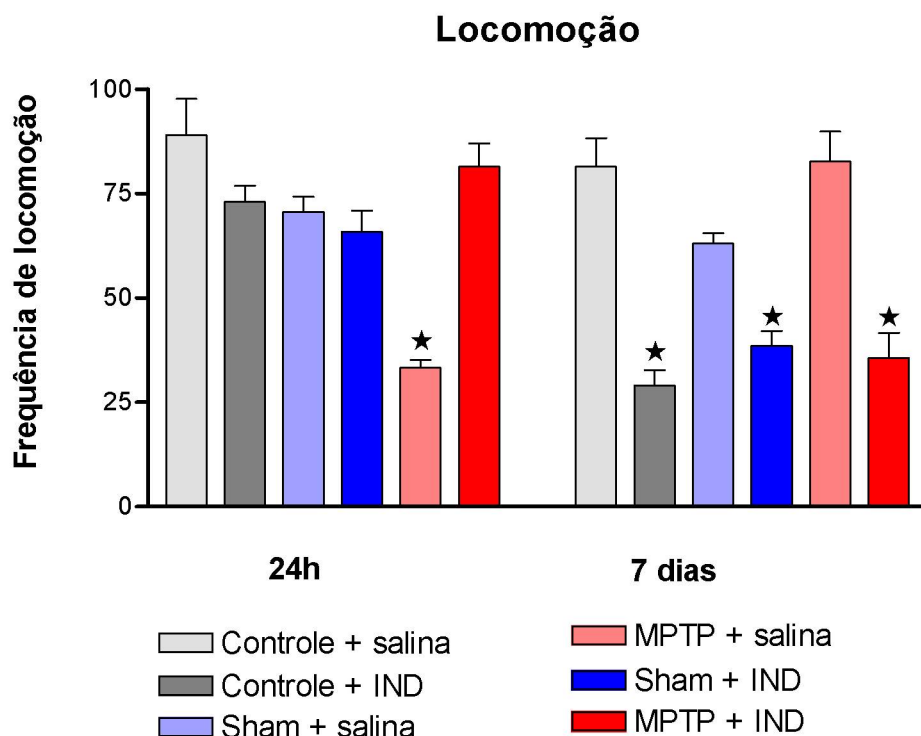


Figura 19: Efeitos da administração de IND na frequência de locomoção de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto. Os animais foram tratados com IND (10 mg/kg) 1 hora antes da cirurgia estereotáxica. O teste de campo

aberto foi realizado 24 horas e 7 dias após a cirurgia, sendo que nesse período os animais foram tratados com IND (1 mg/kg) uma vez ao dia. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=10$ por grupo). $\star P<0,001$ comparado ao grupo controle salina. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

A figura 20 apresenta os dados referentes à administração de IND no modelo do MPTP. As medições do parâmetro de frequência levantar foram feitas 24 horas e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. A ANOVA mostrou que 24 h após a cirurgia houve redução significativa da frequência de levantar dos grupos controle + IND ($P<0,05$), MPTP + salina ($P<0,001$) e MPTP + IND ($P<0,001$) em comparação ao grupo controle + salina. No sétimo dia apenas o grupo controle + IND apresentou redução significativa ($P<0,05$) em comparação ao grupo controle + salina.

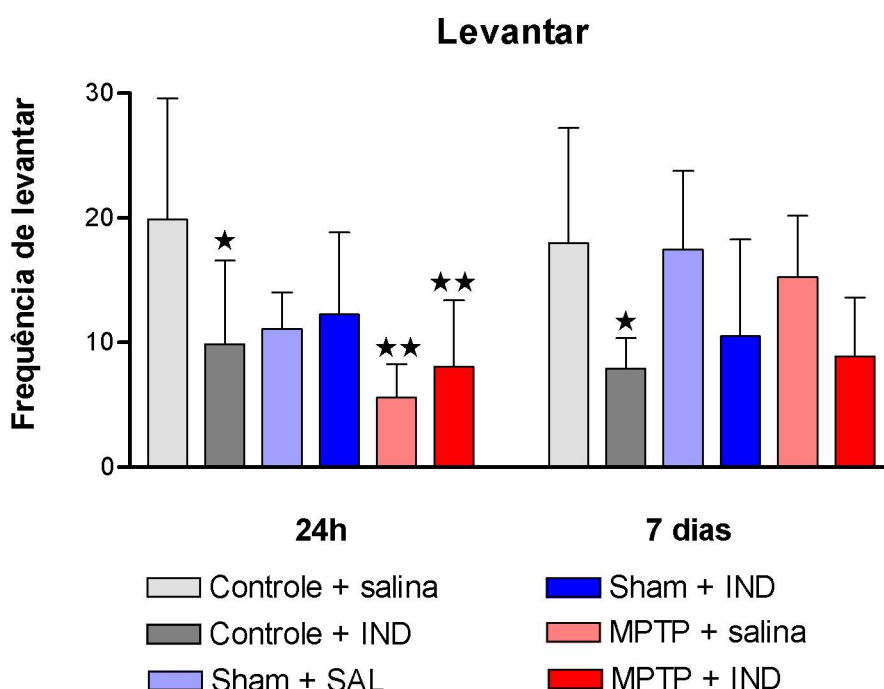


Figura 20: Efeitos da administração de IND na frequência de levantar de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto. Os animais foram tratados com IND (10 mg/kg) 1 hora antes da cirurgia estereotáxica. O teste de campo aberto foi realizado 24 horas e 7 dias após a cirurgia, sendo que nesse período os animais foram tratados com IND (1 mg/kg) uma vez ao dia. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=10$ por grupo). $\star P<0,05$; $\star\star P<0,001$

comparado ao grupo controle + salina. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

A figura 21 mostra os dados referentes à administração de IND no modelo do MPTP. As medições do parâmetro de tempo de imobilidade foram feitas 24 horas e 7 dias após a cirurgia estereotáxica. A ANOVA de uma via mostrou que 24 horas após a cirurgia o grupo MPTP + IND apresentou aumento ($P<0,05$) estatisticamente significativo no tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle + salina. No sétimo dia não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

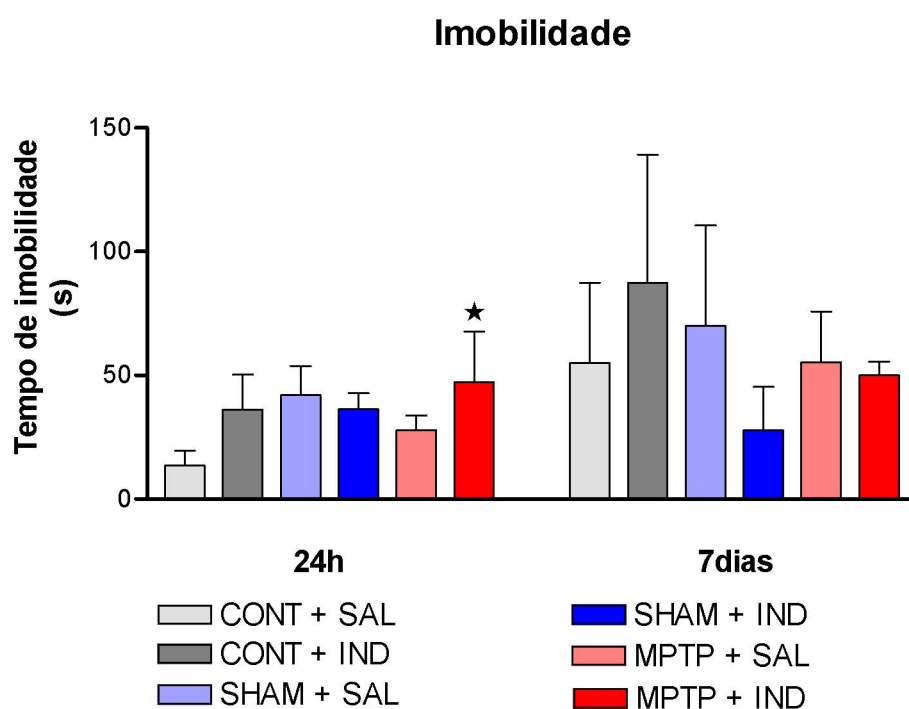


Figura 21: Efeitos da administração de IND no tempo de imobilidade de ratos tratados com MPTP e submetidos ao campo aberto. Os animais foram tratados com IND (10 mg/kg) 1 hora antes da cirurgia estereotáxica. O teste de campo aberto foi realizado 24 horas e 7 dias após a cirurgia, sendo que nesse período os animais foram tratados com IND (1 mg/kg) uma vez ao dia. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=10$ por grupo). $\star P<0,05$ comparado ao grupo controle + salina. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo provêm evidências de que a infusão intranigral de LPS, MPTP ou 6-OHDA gera alterações comportamentais, e também, *up-regulation* da proteína COX-2, de uma maneira dependente de tempo. Além disso, verificamos, através do campo aberto, um efeito neuroprotetor conferido pela IND em animais lesados por MPTP.

A infusão intranigral bilateral de LPS produziu um aumento na frequência de locomoção, observada no campo aberto, no terceiro e sétimo dias de observação (Figura 7). Além disso, os achados de western blotting referentes às amostras de SN obtidas do grupo LPS demonstraram uma *up-regulation* de COX-2 8 e 16 h após a cirurgia (figura 12). Em seguida, os níveis nigrais de COX-2 retornaram ao normal 24 h após a cirurgia. Por outro lado, no estriado, a COX-2 não diferiu em comparação ao grupo não-operado, ao longo dos tempos observados (Figura 13). Nossos resultados mostram que esta reação inflamatória desencadeada pelo LPS na SN foi mais intensa em comparação ao encontrado no estriado. Havendo grande indução de COX-2 de 8 h até o tempo de 16 h após a infusão. Este resultado corrobora, muitos outros da literatura. De acordo com HERRERA *et al.*, (2000), a reação inflamatória, induzida por infusão intranigral de LPS, é mais forte na SN do que no estriado, havendo grande recrutamento de células mononucleares através dos vasos sanguíneos. Diversos estudos têm mostrado que infusões intranigrais de LPS resultam na redução de DA e seus metabólitos no estriado, além de redução no número de neurônios TH-positivos na SN (CASTAÑO *et al.*, 1998; HERRERA *et al.*, 2000; IRAVANI *et al.*, 2002). Neurônios dopaminérgicos mostraram-se sensíveis ao LPS *in vivo*, e esta sensibilidade ocorre exclusivamente quando o LPS é infundido diretamente na SN (CASTAÑO *et al.*, 1998).

A indução de COX-2 produzida por LPS sugere um aumento no estresse oxidativo na SN, não corroborada por um equivalente prejuízo motor, o que por sua vez, poderia ser interpretado como uma manifestação do dano no sistema dopaminérgico. Por outro lado, o aumento na locomoção induzido por LPS 3 e 7

dias após a cirurgia (Figura 7), pode ser interpretado como um mecanismo compensatório por parte dos neurônios que sobreviveram à lesão.

É bem estabelecido que a COX-1 é constitutivamente expressa em praticamente todos os tecidos, incluindo o encéfalo, em neurônios e astrócitos (HEWETT *et al.*, 2000). A COX-2, entretanto, é uma proteína de caráter indutível, sendo constitutivamente expressa em apenas alguns poucos tecidos, incluindo particularmente o encéfalo em diferentes regiões como o córtex, amígdala, hipocampo e corno dorsal da medula (YAMAGATA *et al.*, 1993; BREDER *et al.*, 1995). Além disso, a COX-2 encontra-se induzida 1 – 8 h após processos convulsivos, traumas, hemorragia intracerebral e doenças neurodegenerativas (YAMAGATA *et al.*, 1993; NOGAWA *et al.*, 1998; KNOTT *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; GONG *et al.*, 2001).

Ativação microglial pode ser desencadeada por ativação modificada de proteínas através de processos patogênicos, por antígenos provenientes de agentes infecciosos (como o LPS), príons, ou por uma combinação complexa de moléculas incluindo ATP, AMP_c, interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 (HANISH, 2002; NAKAMURA, 2002). Nesta linha, há um aumento na microglia reativa na SN e estriado de pacientes com DP idiopática (MCGEER *et al.*, 1998; MIRZA *et al.*, 2002). Além disso, a área do encéfalo que engloba a SN (mesencéfalo) abriga a maior densidade da microglia no encéfalo (KIM *et al.*, 2000).

Em investigações *postmortem* de encéfalos humanos expostos ao MPTP, foi detectada a presença de microglia ativada até 16 anos após a última exposição à neurotoxina (LANGSTON *et al.*, 1999). A microglia ativada e perda de neurônios dopaminérgicos são também encontrados na SN de primatas anos após tratamento com MPTP (MCGEER *et al.*, 2003). Além disso, uma reação microglial transitória foi verificada do primeiro ao 14º dia na SN e no estriado de camundongos que receberam injeções intraperitoneais de MPTP (KOHUTNICKA *et al.*, 1998). Estes achados sugerem que a microglia participa ativamente na etiologia da DP, dessa forma, podendo perpetuar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, uma que ativada (HALD & LOTHARIUS, 2005).

O modelo de parkinsonismo induzido por MPTP pode ser considerado um bom modelo para estudar o prejuízo na atividade motora associada à DP. Este estabelecido modelo tem sido reproduzido em nosso grupo, havendo redução significativa nos níveis estriatais de DA além de hipolocomoção verificadas em animais lesados por MPTP (DA CUNHA *et al.*, 2001; GEVAERD *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 2004). Nossos resultados comportamentais corroboram estes dados, sendo que o grupo lesado com MPTP mostrou prejuízo motor indicado pela diminuição nas frequências de locomoção e levantar 24 h após a cirurgia (Figuras 7 e 8). A expressão máxima de COX-2, observada na SN para o modelo do MPTP, foi às 16 h. A expressão de COX-2 é induzida especificamente em neurônios dopaminérgicos da SNpc em amostras postmortem de pacientes portadores de DP e também no modelo animal que utiliza injeções intraperitoneais de MPTP em camundongos (TEISMANN *et al.*, 2003). Também reporta-se que a redução ou a inibição de COX-2 atenuam o processo de neurodegeneração induzido por MPTP (TEISMANN *et al.*, 2003). Em nossos resultados, não observamos nenhum aumento na expressão de COX-2 no estriado. Por outro lado, PRZYBYŁKOWSKI *et al.* (2004) demonstraram que a administração de MPTP em camundongos, produziu degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, levando ao aumento na expressão da proteína COX-2 no estriado 3 a 7 dias após a administração de MPTP. Nós sugerimos que esta discrepância na expressão estriatal de COX-2 esteja provavelmente relacionada às diferentes espécies utilizadas e, portanto nas doses de MPTP administradas. Entretanto estes achados provêm maiores evidências de que o MPTP é um modelo capaz de mimetizar prejuízos neuroquímicos e motores, além do processo neuroinflamatório, especialmente 16 h (Figura 14) após a cirurgia, em nosso modelo.

A 6-OHDA é outra neurotoxina capaz de induzir degeneração nigroestriatal regional, quando infundida em roedores, em um padrão topográfico muito similar a DP idiopática (RODRIGUEZ *et al.*, 2001). Administração intraestriatal de 6-OHDA em camundongos causa ativação microglial na SN nos primeiros 3 dias após a infusão (ORR *et al.*, 2002).

Os presentes resultados indicam que a infusão de 6-OHDA causou severo prejuízo motor, indicado pelo decréscimo nas frequências de locomoção (24 h, Figura 7) e levantar (24 h, 3 e 7 dias, Figura 8). Paralelamente, estes animais apresentaram aumento nos tempos de latência (24 h, 3 e 7 dias, Figura 6) e imobilidade (24 h 3 e 7 dias, Figura 9). Também demonstramos uma indução aguda de COX-2, iniciada 4 h após a cirurgia na SN sendo detectada até 24 h (Figura 16). Por outro lado, não foi detectada indução de COX-2 no estriado, ao longo dos diferentes tempos observados (Figura 17).

Em resumo, sugerimos que o LPS pode ser considerado um modelo do processo neuroinflamatório ocorrido na DP, em função da indução de expressão de COX-2 poucas horas após a exposição. Surpreendentemente, o LPS não foi capaz de produzir prejuízo motor, que por sua vez é a característica mais marcante na doença. Por outro lado, o modelo induzido por MPTP mimetizou o prejuízo motor, além da resposta neuroinflamatória, gerando um pico de indução de COX-2 16 h após a cirurgia, desta forma caracterizando-se um modelo de fase inicial da DP. Já 6-OHDA produziu a mais longa indução de COX-2 (4-24 h após cirurgia), o que indica que o processo neuroinflamatório foi mais severo, em comparação as outras neurotoxinas. Desta maneira, os presentes dados corroboram os resultados da literatura que indicam que tanto a infusão intranigral de 6-OHDA quanto a de MPTP apresentam características desejáveis para um modelo animal de DP. Os animais apresentam evidentes prejuízos motores nas primeiras horas após a lesão, além de expressão aumentada de COX-2. O que sugere um aumento do processo inflamatório na via nigroestriatal.

A SN foi muito mais sensível, em termos de indução da expressão de COX-2, do que o estriado para todas as neurotoxinas avaliadas. De acordo com o protocolo empregado as neurotoxinas em questão geram apenas uma pequena lesão nigral. Segundo FERRO *et al.*, (2005), a infusão intranigral de 6-OHDA causa perda mais pronunciada de neurônios dopaminérgicos do que o mesmo procedimento com MPTP. Entretanto a lesão gerada por 6-OHDA não causa um grau de depleção proporcional a maior morte neuronal, em comparação ao MPTP.

De fato, estes resultados correspondem com nossos dados quanto à ausência de indução de COX-2, observada no estriado.

Após a confirmação da indução da expressão de COX-2 mediada pela infusão intranigral de MPTP, avaliamos a IND, um AINE com atividade inibitória não seletiva para a COX, ou seja, ambas as isoformas são inibidas por esta droga. Desta forma, esperou-se bloquear totalmente o processo neuroinflamatório, que em teoria, deveria ser gerado pela infusão bilateral de MPTP na SNpc. Nossa hipótese é que bloqueando a neuroinflamação deve-se observar algum grau de neuroproteção que foi visualizado e quantificado comportamentalmente utilizando-se o teste do campo aberto.

Os resultados sugerem que o grupo MPTP+salina mostrou redução significativa nos parâmetros de locomoção e levantar, além de aumento significativo no parâmetro de latência 24 horas após a cirurgia, em comparação ao grupo controle+salina. O grupo de animais tratados concomitantemente com MPTP e indometacina (MPTP + IND) apresentou aumento significativo dos parâmetros de locomoção (Figura 19), e frequência de levantar (Figura 20) e redução no tempo de latência em comparação ao grupo MPTP+salina 24 horas após a cirurgia (Figura 18). No entanto, observou-se um efeito de hipolocomoção e de aumento no tempo de imobilidade nos grupos tratados com este antiinflamatório, 7 dias após a cirurgia (Figuras 19 e 21).

Sugerimos que a indometacina atenuou os efeitos de alteração motora provocados pelo MPTP 24 horas após a cirurgia estereotáxica. A indometacina pareceu ser seletiva, ao que tange o seu possível efeito neuroprotetor, pois apenas os grupos lesados que foram administrados com este antiinflamatório, apresentaram os parâmetros de frequência de locomoção (Figura 19), frequência de levantar (Figura 20) e tempo de latência (Figura 18) preservados frente ao grupo lesado por MPTP e que apenas recebeu salina. Entretanto, este antiinflamatório causou redução significativa no parâmetro de frequência de locomoção desses animais, quando testados no campo aberto sete dias após a cirurgia (Figura 19). Este fato pode ter ocorrido em virtude de um possível efeito depletor de dopamina (KURSKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 2002) provocado

pelo antiinflamatório ao longo do tratamento. Sugerimos que este efeito não seja dependente da inibição das isoformas da COX, pois a dose pré-operatória de 10 mg/kg de indometacina foi efetiva para fazer este efeito inibitório. Portanto algum prejuízo motor dever-se-ia ser observado no teste realizado 24 horas após a cirurgia estereotáxica.

Tomados em conjunto, nossos dados indicam que nos três modelos animais de parkinsonismo avaliados, ocorreu *up-regulation* da proteína COX-2 após infusão das neurotoxinas. Este resultado corrobora dados da literatura que apontam à inflamação como um agente etiológico envolvido nos mecanismos de lesão dos neurônios dopaminérgicos. Entretanto, outros mediadores do processo inflamatório deverão ser investigados para que haja uma maior compreensão da relação existente entre inflamação e DP. As análises comportamentais, dos animais que receberam as toxinas, mostram que o LPS não alterou o comportamento motor dos ratos; o MPTP produziu alterações reversíveis e a 6-OHDA produziu prejuízo motor intenso nos animais. Mais ainda, os resultados da presente investigação indicam que a indometacina impediu a ocorrência de prejuízo motor, uma decorrência da lesão por MPTP, sugerindo um efeito neuroprotetor mediado pela inibição da COX-2.

6. CONCLUSÕES

- Os modelos animais de parkinsonismo induzidos por MPTP e 6-OHDA demonstraram-se eficazes quanto a promover prejuízos motores 24 horas após suas infusões na SNpc.
- O modelo de parkinsonismo induzido por LPS não se mostrou adequado em reproduzir os efeitos de prejuízo motor, observados no campo aberto.
- A infusão intranigral de LPS induziu aumento de expressão de COX-2 na SN, nos tempos de 8 e 16 h, indicando o surgimento de um processo neuroinflamatório. Desta forma sugerimos que o modelo de parkinsonismo induzido por LPS é adequado para mimetizar um processo neuroinflamatório, semelhante ao ocorrido na doença, embora essa neurotoxina não foi capaz de gerar o prejuízo motor, característico da doença. Nenhuma alteração de expressão de COX-2 foi verificada no estriado.
- A infusão intranigral de MPTP causou aumento de expressão de COX-2 observado 16 h após a lesão na SN. Nenhuma alteração de expressão foi verificada no estriado.
- A infusão intranigral de 6-OHDA produziu aumento de expressão de COX-2 observada de 4 a 24 h após a cirurgia. Nenhuma alteração de expressão foi verificada no estriado.
- Sugerimos que o fato de não ser possível identificar nenhuma alteração nos níveis de expressão de COX-2 no estriado, nos três modelos estudados, seja em decorrência de uma pequena extensão da lesão gerada pelas neurotoxinas.

- A indometacina demonstrou-se eficiente em prevenir o prejuízo motor, gerado pela infusão intranigral de MPTP, 24h após a cirurgia. No entanto verificamos um prejuízo motor 7 dias após a cirurgia, sendo um indicativo de alteração no sistema dopaminérgico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKI, E., *et al.* "Cyclooxygenase-2 inhibitor ns-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity." *Stroke* **32**: 2370-2375. 2001.

ARIMOTO, T. & BING, G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **12**: 35-45. 2003.

AUBIN, N., O. CURET, *et al.* "Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice." *J. Neurochem* **71**: 1635-1642. 1998.

ALMER, G.; GUEGAN, C.; TEISMANN, P.; NAINI, A.; ROSOKLIJA, G.; HAYS, A. P.; CHEN, C.; PRZEDBORSKI, S. *Ann. Neurol.*, v.49, p.176-185. 2001.

ANDREASSON, K. I.; SAVONENKO, A.; VIDENSKY, S.; GOELLNER, J.J.; ZHANG, Y.; KAUFMANN, W. E. *J. Neurosci*, v.21, p.8198-8209. 2001.

BALLARD, P. A. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, v.35, p.949-956. 1985.

BAZAN, N. G. COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. *Nature Medicine*, v.7, April 2001, p.414-415. 2001.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, p.325-332. 2001.

BEN-SCHACHAR D, YODIM MBH. Intranigral iron injections induces behavioral and biochemical "Parkinsonism" in rats. *J. Neurochem.* 57, 2133-2135. 1991.

BREDER, C. D., DEWITT, D., KRAIG, R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* **355**: 296-315. 1995.

CALNE, B. D., Parkinson's disease is not one disease. *Parkinsonism Relat. Disorders*. **7**: 3-7. 2001

CARLSSON, M. & A. CARLSSON. Marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice following treatment with atropine in combination with clonidine. *J. Neural Transm*, p.317-322. 1989.

CASTAÑO, A., HERRERA, A. J., CANO, J., MACHADO, A. Lipopolyssaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* **70**: 1584-1592. 1998.

CASTAÑO, A., *et al.* "The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma." *J. Neurochem.* **81**: 150–157. 2002.

CHANDRA, S. *et al.* Double-Knockout mice for α - and β -synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 14966-14971. 2004.

CICCHETTI, F., *et al.* "Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging." *Eur. J. Neurosci.* **15**: 991-998. 2002.

DA CUNHA, C., GEVAERD, M. S., VITAL, M. A. B. F., MIYOSHI, E., *et al.* Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* **124**: 9-18. 2001.

DANYSZ, W., M. GOSSEL, *et al.* Are NMDA antagonistic properties relevant for antiparkinsonian-like activity in rats? Case of amantadine and memantine. *J. Neural Transm*, v.7, p.155-166. 1994.

DAUER, W., *et al.* Resistance of α -synuclein null mice to the Parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 14524-14529. 2002.

DAWSON, T.M. New animal models for Parkinson's disease. *Cell*. **101**: 115-118. 2000.

DAWSON, T.M & DAWSON, V.L. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* **111**: 145-151. 2003.

DUNNETT, S. B. e A. BJORKLUND. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*, v.399, p.A32-A39. 1999.

ERIKSEN, J.L., PRZEDBORSKI, S., PETRUCELLI, L. Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *TRENDS in Mol. Medicine* **11**: 91-96. 2005.

FEANY, M. B. e W. W. BENDER. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, v.404, p.394-398. 2000.

FERRO, M. M., BELLISSIMO, M. I., ANSELMO-FRANCI, J. A., ANGELLUCCI, M. E. M., *et al.* Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods* **148**: 78-87. 2005.

FLOWER, R. J. The development of cox-2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.2, March 2003, p.179-192. 2003.

FOG, R. On sterotypy and catalepsy: studies on the effect of amphetamines and neuroleptics in rats. *Acta Neural. Scand.*, v.50, p.1-66. 1972.

GAO, HUI. MING.; LIU, B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration in dopamine neurons. *J. Neurosci*, v.22, p.782-790. 2002.

GAO, HUI. MING.; LIU, B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.24, p.395-400. 2003.

GERLACH, M. e P. RIEDERER. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*, v.103, p.987-1041. 1996.

GEVAERD, M. S, MIYOSHI, E., SILVEIRA, R., CANTERAS, N. S, *et al.* L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats . *Int J Neuropsychopharmacol* **4**: 361-370. 2001.

GONG, C., ENNIS, S. R., HOFF, J. T., KEEP, R. F. Inducible cyclooxygenase-2 expression after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res* **901**: 38-46. 2001.

GORELL, M. *et al.* Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J. Neurol. Sciences*. **217**: 169-174. 2004.

GRUNBLATT, E., MANDEL, S., YODIM, M. B. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann NY Acad Sci* **899**: 262-273. 2000.

HALD, A. & LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Exp. Neurol.* in press. 2005.

HANISH UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**: 140-155. 2002.

HERNAN, M. A., TAKKOUICHE, B., CAAMANO-ISOMA, F., GESTAL-OTERO, J. J. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **52**: 276-284. 2002.

HEWETT, S. J., ULIASZ, T. F., VIDWANS, A. S., HEWETT, J.A. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 417-425. 2000.

HERRERA, A. J., CASTAÑO, A., VENERO, J. L., CANO, J., MACHADO, A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* **7**: 429-447. 2000.

HOLST, O., ULMER, A. J., BRADE, H. D., FLAD., RIETSCHEL, E. T. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**: 83-104. 1996.

HUNOT, S., A. HARTMANN, *et al.* The inflammatory response in the Parkinson brain. *Clinical Neuroscience Research* **1**: 434-443. 2001.

IRAVANI, M. M., KASHEFI, K., MANDER, P., ROSE, S., *et al.* Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* **110**: 49-58. 2002.

JELLINGER, K. *Pathology of Parkinson's syndrome*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer, v.88. 1988. 47-112 p.

JELLINGER, K.. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem Neuropathol*, v.14, p.153-197. 1991.

KIM, W. G., MOHNEY, R. P., WILSON, B., JEOHN, G. H., et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* **20**: 6309-6316. 2000.

KITAMURA, Y. The parkinsonian models: invertebrates to mammals. *Jpn. J. Pharmacol.*, v.84, p.237-243. 2000.

KITAMURA, Y.. Neuroprotective mechanisms of parkinsonian dopamine D2-receptor subfamily agonists. *Neurochem. Res.*, v.28, p.1035-1040. 2003.

KNOTT, C., STERN, G., WILKIN, G. P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: NOS-2, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* **6**: 724-739. 2000.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I. et al. "The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse." *Exp. Neurol.* **150**: 50-61. 1999.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., BABIUCH, M. JONIEC, I., et al., Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *International Immunopharmacology*. **2**: 1213-1218. 2002.

LANG, E. & A. M. LOZANO. Parkinson's disease. First of two parts. *N. England. J. Med*, v.339, p.1044-1053. 1998.

LANGSTON, J. W. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, v.219, p.979-980. 1983.

LANGSTON, J. W., FORNO, L. S., TETRUD, J., REEVES, A. G, *et al.* Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methy-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* **46**: 598-605. 1999.

LIBERATORE, G. T., JACKSON-LEWIS, V., VUKOSAVIC, S., MANDIR, A. S., VILA, M., MACAULIFFE, W. G., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M, PRZEDBORSKI, S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Nat Med* **5**: 1403-1409. 1999.

MARCHESELLI, V.L. & BAZAN, N.G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. *J. Biol. Chem.* **271**: 24794–24799. 1996.

MATHISON, J. C., WOLFSON, E., ULEVITCH, R. J. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest.* **81**: 1925-1937. 1988.

MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., BOYES, B. E., MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**: 1285-1291. 1998.

MCGEER, P. L. & E. G. MCGEER. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **22**: 799–809. 2001.

MCGEER, P. L., SCWAB, C., PARENT, A., DOUDET, D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol* **54**: 599-604. 2003.

MCRAE-DEGUEURCE A, GOTTFRIES CG, et al. (1986). "Antibodies in the CSF of a Parkinson patients recognizes neurons in rat mesencephalic regions." *Acta Physiol Scand* **126**: 313-315.

MIRZA, B., HADBERG, H., THOMSEN, P., MOOS, T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* **95**: 425-432. 2000.

MIYOSHI, E., WIETZIKOSKI, S., CAMPLESSEI, M., SILVEIRA, R., et al. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Res Bull* **58**: 41-47. 2002.

MOGI, M., et al. "Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- alpha in 6 hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF alpha induction." *Neurosci. Lett.* **268**: 101-104. 1999.

NAGATSU T, MOGI M, et al. (2000). "Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease." *J Neural Transm [Suppl]* **60**: 277-290.

NAKAMURA Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* **25**: 945-953. 2002.

NOGAWA, S., F. ZHANG, et al. *J. Neurosci*, v.17, p.2746-2755. 1997.

O'BANNION, M. K. *Crit. Rev. Neurobiol.*, v.13, p.45-82. 1999.

ORR, C. F., ROWE, D. B., HALLIDAY, G. M. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. **68**: 325-340. 2002.

PERIQUET, M. *et al.* *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* **126**: 1271-1278. 2003.

PERRY, J. C., DA CUNHA, C., ANSELMO-FRANCI, J., ANDREATINI, R., *et al.* Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. *European Journal of Pharmacology* **484**: 225-233. 2004.

PRZEDBORSKI, S., JACKSON-LEWIS, V., YOKOYAMA, R., SHIBATA, T., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4565-4571. 1996.

PRZEDBORSKI, S. & VILA, M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model. a tool to explore the pathogenesis of parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci*. **991**: 189-198. 2003.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. **11**: 3-7. 2005.

PRZYBYLKOWSKI, A., KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., JONIE, I., CIESIELSK, A., *et al.* Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Research* **1019**: 144-151. 2004.

RODRIGUEZ, M., BARROSO-CHINEA, P., ABDALA, P., OBESO, J., GONZALEZ-HERNANDEZ, T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular

administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* **169**: 163-181. 2001.

ROWE, D. B., LE, W., SMITH, R. G., APPEL, S. H. Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. *J Neurosci Res.* **53**: 551–558. 1998.

SAIRAM, K., SARAVANAN, K., BANERJEE, R., MOHANAKUMAR, K. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium – induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Research.* **966**: 245-252. 2003.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, *et al.* Molecular cloning a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.*, v.2.ed. 1989.

SAIRAM, K. *et al.*, "Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4- phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats." *Brain. Res.* **966**: 245–252. 2003.

SEIDEN, L. S., M. W. FISHMAN, *et al.* Long-term methamphetamine induced changes in brain catecholamines in tolerant rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend*, v.1, p.215-219. 1975.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, v.9, n.8, p.360-365. 2003.

SPECIALE, S. G. MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.24, p.607-620. 2002.

TANNER, C. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* **10**: 317-329. 1992.

TEISMANN, P. and B. FERGGER. "Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTPmouse model of Parkinson's disease." *Synapse* **167–174**: 167–174. 2001.

TEISMANN, P., K. TIEU, *et al.* Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *PNAS*, v.100, n.9, p.5473-5478. 2003.

THE QIA EXPRESSIONIST. A handbook for high-level expression and purification of 6x His-tagged proteins, QIAGEN. 2003.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.*, **367**: 69-93. 1971.

VALLDEORIOLA, F., NOBBE, F. A., TOLOSA, E. Treatment of behavoiural disturbances in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **51**: 175-204. 1997.

VILA, M., & PRZEDBORSKI, S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat. Med.* **10**: 58-62. 2004.

YAMAGATA, K., ANDREASSON, K.I., KAUFMANN, W.E., BARNES, C.A. & WORLEY P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**: 371–386. 1993.

8. ANEXO

Different parkinsonism models induce a time dependent induction of COX-2 in the brain

Marcelo de Meira Santos Lima¹, Angela Reksidler Braga¹, Sílvia Marques Zanata², Hidevaldo Bueno Machado^{1‡}, Sergio Tufik³ and Maria A. B. F. Vital^{1†}

- (1) Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;
- (2) Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;
- (3) Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil;

†Corresponding Author

Dr. Maria A. B. F. Vital

Universidade Federal do Paraná

Setor de Ciências Biológicas

Departamento de Farmacologia

Av. Francisco H. dos Santos s/n

CEP: 81.531 – 990

Caixa Postal: 19031

Curitiba – Paraná – Brasil

FAX number: 0055-041-266 2042

0055-041-361 1720

E-mail: vital@ufpr.br

‡ Present address: Department of Molecular and Medical Pharmacology,
University of California - Los Angeles, USA.

ABSTRACT

The present study investigated the effects on general activity and COX-2 protein expression of intranigral LPS (lipopolysaccharide), MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and 6-OHDA (6-hydroxydopamine) infusion on rats. The results indicate that LPS produced an increase in locomotion frequency (3 and 7 days after surgery), and a strong up-regulation of COX-2 protein 16 h and 24 h after surgery, as observed in the Substantia nigra (SN). The MPTP model generated impairment in locomotion and rearing frequencies 24 h after surgery. Besides this, MPTP caused a marked up-regulation in COX-2 protein, observed in the SN, 16 h after surgery. Moreover, the 6-OHDA model produced severe motor impairment indicated by the decrease in locomotion (24 h) and rearing (24 h, 3 and 7 days) frequencies, and also an increase in latency (24 h, 3 and 7 days) and immobility (24 h and 3 days) times. We also demonstrated an up-regulation of COX-2, which occurred in the SN 4-24 h after surgery.

For all the models analyzed, we observed no statistic differences in the expression of COX-2 in the striatum along the time points. The results of the present study suggest that different patterns of COX-2 induction appeared according to the neurotoxin tested. Nevertheless that time dependent induction was relatively constant, which by itself, is significant considering the importance of neuroinflammatory process in Parkinson's disease (PD).

Keywords: LPS (lipopolysaccharide), MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), neuroinflammation, COX-2 (cyclooxygenase-2), Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is one of the most common chronic progressive neurological disorders, affecting 3% of the population over the age of 65 [26]. Research into the pathogenesis of PD has been rapidly advanced by the development of animal models that also permit the investigation of new treatments. Some of these models are achieved by the use of neurotoxins, in particular MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), and recently LPS (lipopolysaccharide).

Currently, none of the models fully recapitulate all of the clinical key and neuropathologic features of PD. However, because each of the models do recapitulate significant pathological features of PD and represent parts of the same puzzle, combinatorial study of multiple models are warranted to provide a more fully developed view of PD pathogenesis [8].

Several factors including neuroinflammation are believed to be involved in the pathogenesis of PD. Thus, epidemiological studies suggest that inflammation increases the risk of developing a neurodegenerative condition such as Alzheimer's disease (AD) and PD [48]. Inflammatory processes associated with an increased expression of the enzyme cyclooxygenase type 2 (COX-2) and elevated levels of prostaglandin E₂ (PGE₂) have been implicated in the cascade of deleterious events leading to a neurodegeneration. COX-2 expression has been shown to be induced specifically in SNpc dopaminergic neurons in human postmortem PD specimens and in the MPTP mouse model of PD during the destruction of the nigrostriatal pathway [47].

COX-2 is strongly suspected of playing a detrimental role in neurodegeneration and the stimulation of an inflammatory process following neuronal death. COX-2 may aggravate the degenerative process through pro-inflammatory mechanisms, and also by ROS formation [18,47]. It has been shown that COX-2 expression in neurons correlates with their apoptosis and is involved in the neuronal response to stress [37]. The increase in COX-2 expression and activity appears very early after the onset of stress, and accounts, at least in part,

for the accumulation of oxidative mediators in this condition [30]. The inhibition of COX-2 alone or both COX-1 and 2, by selective and non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in models of neural injury was shown to provide neuroprotective effect [2,35,45,25]. COX-2 may also play an important role in MPTP toxicity, since COX-2 knockout animals are less susceptible to MPTP insult than their wild type relatives. About 20% greater preservation of neurons in the SN and twice the tyrosine hydroxylase (TH) expression in the striatum has been observed in COX-2 gene-deficient mice as compared to the wild type after MPTP intoxication [10].

The aim of the present study was to evaluate the behavioral effects and the COX-2 expression profile in the SN and striatum in rat models of PD induced by LPS, MPTP or 6-OHDA.

MATERIALS AND METHODS

Animals

One hundred and thirty-four adult male Wistar rats from our colony weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. The animals were maintained in a temperature controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12 h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.) with free access to food and water. All the behavioral experiments were conducted between 2:00 and 6:00 p.m. The animals used in this study were maintained and handled in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals Resources, National Research Council, USA.

Stereotaxic Surgery

The animals were divided at random and equally into the following groups: non-operated animals, sham-operated animals, MPTP-injected group, 6-OHDA-injected group and LPS-injected group. All the operated rats received atropine sulphate (0.4 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) and penicillin G-procaine (20,000 U in 0.1 ml, intramuscular) and were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg). MPTP–HCl (100 μg in 1 μL of saline; Sigma, St. Louis, MO, USA), 6-OHDA (6 μg

in 2 μ L of artificial cerebrospinal fluid, aCSF, supplemented with 0.2% ascorbic acid; Sigma) and LPS (2 μ g in 1 μ L of saline; from *Escherichia coli*, serotype 0111:B4; Sigma) was bilaterally administered through a 30-gauge stainless needle at a rate of 0.33 μ L/min, for 3 min, according to the following coordinates: anteroposterior (AP): - 5.0 mm from bregma; mediolateral (ML): \pm 2.1 mm from midline; dorsoventral (DV): - 7.7 mm from skull, adapted from Paxinos and Watson [40]. Sham operations followed the same procedure but using 1 μ L of aCSF for the bilaterally injection into the SNpc. The composition of the aCSF was as follows: 148 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, and 0.85 mM MgCl₂.

Behavioral Tests

To determine behavioral changes in these three models of PD (MPTP, 6-OHDA and LPS) we chose the open-field as a test of general activity. Fifty rats were divided into five groups: non-operated ($n = 10$), sham ($n = 10$), MPTP ($n = 10$), 6-OHDA ($n = 10$) and LPS ($n = 10$). Each group, except the non-operated and sham groups, received a bilateral administration of a neurotoxin. The open-field was performed 24 hours, 3 and 7 days after the surgeries for all groups.

We employed the open-field constructed according to Broadhurst [5]. The testing arena was round with a diameter of 97 cm. The circular wall was 32.5 cm high and was constructed of aluminium sheeting. The arena was situated on a wood floor. The floor and walls were painted white. The arena floor was divided into three concentric circles. The small inner circle had a diameter of 23 cm; the second circle had a diameter of 61 cm and the arena wall defined the outside circle. Each circle was divided into essentially equal size areas. The number of areas in the inner circle, middle and outer circles was 1, 6 and 12, respectively. A 100-W ceiling light was situated 48 cm above the arena floor. Cheesecloth was draped from the ceiling and dropped outside the arena wall. The cloth served to diffuse the light and functioned as a one-way screen. Rats were observed individually for 5 min, the different groups were inter-mixed and the animals were tested in the same order every day. Hand-operated counters were used to score locomotion frequency (number of floor units entered), rearing frequency (number of

times the animals stood on their hind legs), immobility time (number of seconds of lack of movement during testing) and latency time (time taken to initiate movement). The apparatus was washed with a water–alcohol (5%) solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

Preparation of Cytosolic Extract for Western Blotting Analysis

To determine the expression profile of COX-2 and COX-1 we used eighty four rats divided into the same five groups: non-operated, sham, MPTP, 6-OHDA and LPS. Three animals were used for each time point (4h, 8h, 16h, 24h, 3 days and 7 days), that had been determined after the surgeries.

Animals were killed by decapitation, according to the time points, and their brains were quickly dissected. The SN and striatum are immediately frozen in liquid nitrogen until the lysis procedure performed in a 1.5 mL Eppendorf tube by using a pestle in presence of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 20 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and protease inhibitors (Complete tablet; Roche, Indianapolis, IN). After incubation on ice for 30 min extracts were centrifuged at 10 000 g for 20 min at 4°C, and the supernatants for protein extracts were collected and stored at -80°C for further western blotting analysis. Protein concentrations were measured by the Lowry method [29].

COX-2 and COX-1 Expression

Protein samples (50 μ g) were analyzed in 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. The membranes were probed overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibodies against COX-2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and COX-1 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), followed by incubation with a secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10 000; Santa Cruz Biotechnology) for 50 min, and visualized by chemiluminescence (Santa Cruz Biotechnology). The bands were quantified by using the software ImageJ 1.32j public domain (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Statistical Analysis

The open field data were concluded to be parametric by the Bartlett's test [20]. Therefore, two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was employed to detect differences between the two factors analyzed, treatments and time. For behavioral data, the Tukey test was used as *post hoc* when it was indicated by ANOVA. Western blotting data were analyzed by ANOVA and Newman-Keuls test. Differences were considered significant if $P < 0.05$. The values were reported as mean \pm S.E.M.

RESULTS

Effects of LPS, MPTP and 6-OHDA models in the general activity

Locomotion frequency illustrated in the Figure 1 shows a significant reduction in the groups that received MPTP ($P < 0.05$) and 6-OHDA ($P < 0.001$) injection in comparison to non-operated and sham groups, 24 h after the surgery [$F(4,36) = 15.40$; $P < 0.0001$]. Three days after the surgery only the LPS group exhibited an increase in locomotion ($P < 0.01$), compared to the non-operated and sham groups [$F(4,36) = 13.24$; $P < 0.0001$]. On the 7th day after the surgery, the LPS and MPTP groups still showed an increase in locomotion frequency ($P < 0.05$) in comparison to the control groups [$F(4,36) = 12.39$; $P < 0.0001$].

The rearing frequencies presented in Figure 2 indicate that only the 6-OHDA group showed a significant decrease 24 h [$F(4,36) = 5.05$; $P < 0.01$], 3 [$F(4,36) = 9.72$; $P < 0.05$] and 7 days [$F(4,36) = 6.21$; $P < 0.05$] after surgery, when the animals were compared to the control groups.

The latency in initiating movement illustrated in Figure 3 only revealed a significant increase in this parameter for 6-OHDA group at all three time points measured. Twenty four hours after surgery the latency of the 6-OHDA group was higher ($P < 0.001$) compared to the control group [$F(4,36) = 20.65$; $P < 0.0001$]. Moreover, 3 and 7 days after the surgery the latency of this group increased in comparison to the control groups [$F(4,36) = 11.63$ $P < 0.0001$; [$F(4,36) = 8.86$ $P < 0.0001$, respectively].

The immobility time illustrated in Figure 4 only shows a significant increase in rats from the 6-OHDA group at 24 h [$F(4,36) = 4.90$; $P < 0.05$] and 3 days [$F(4,36) = 13.16$; $P < 0.001$] after surgery in comparison to the control groups. In contrast, the analysis of immobility time 7 days [$F(2,18) = 1.29$; $P = 0.30$] after surgery indicated no difference in this motor sign.

COX-2 expression induced in SNpc and striatum by intranigral infusion of LPS, MPTP and 6-OHDA.

We first analyzed the COX-2 expression profile of a sham group to demonstrate that induction of COX-2 occurs mediated only by a neurotoxin injection, and not by the surgical procedure. Figure 5a indicates that COX-2 was not up-regulated through the timepoints in the SN, in comparison to the non-operated group. At the same level, the surgery procedure did not alter COX-2 expression in the striatum compared to the non-operated group (Figure 5b).

In contrast, intranigral injection of LPS significantly elevated the expression of COX-2 in the SN 8 h ($P < 0.01$) and 16 h ($P < 0.05$) after surgery in comparison to the non-operated group (Figure 6a). Twenty-four hours, 3 and 7 days after surgery, the levels of COX-2 protein showed no statistical difference when compared to the non-operated group (Figure 6a). On the other hand, the LPS group did not exhibit significant variations in COX-2 protein expression in the striatum along the time points (Figure 6b).

The analysis of the SN obtained after performing the MPTP model revealed a significant increase in the COX-2 protein expression 16 h after surgery in comparison to the non-operated group ($P < 0.05$) (Figure 7a). After that time point, the levels of COX-2 decreased until they revealed no statistical differences (24 h, 3 and 7 days) in comparison to the non-operated group. Similarly, to the LPS treatment, in the MPTP model the COX-2 expression level remained constant in all time points analyzed (Figure 7b).

The model elicited by 6-OHDA provoked the most drastic up-regulation in COX-2 protein content in the SN (Figure 8a). The first time point observed (4h) showed a significant elevation of COX-2 ($P < 0.001$) in comparison to the non-

operated group. The levels of COX-2 protein were kept high in that tissue for 8 h ($P<0.001$), 16 h ($P<0.001$) and 24 h ($P<0.01$) after surgery in comparison to the non-operated group. COX-2 expression decreased to non-significant values at 3 and 7 days when compared to the non-operated group. In the striatum, nevertheless, COX-2 protein expression did not differ from the non-operated group (Figure 8b).

DISCUSSION

The results of this study provide evidence that intranigral injection of LPS, MPTP or 6-OHDA elicits behavioral alterations, and also, up-regulation of COX-2 protein in a time dependent manner after the neurotoxin insult. The bilateral intranigral injection of LPS produced an increase in the locomotion frequency of the animals observed in the open-field. Moreover, immunoblotting findings for SN samples obtained from the LPS group demonstrated an up-regulation of COX-2 8 and 16 h after surgery (Figure 6a). Additionally, the nigral levels of COX-2 returned to normal 24 h after surgery. On the other hand, COX-2 protein in the striatum did not differ from the non-operated group throughout the time points (Figure 6b). Our results show that the inflammatory reaction elicited by LPS in the SN was stronger than that in the striatum, with a large induction of COX-2 starting at 8 h and continuing until the time point 16 h. This result corroborates many others from the literature. According to Herrera and colleagues [16] the inflammatory reaction induced by intranigral injection of LPS is stronger in the SN than that in the striatum with a large extension of mononuclear cell recruitment through the blood-vessels. Several studies have shown that nigral LPS injection results in the reduction of DA and its metabolites, besides the reduction of nigral TH-positive neurons [6,16,19]. DA neurons were sensitive to LPS *in vivo* and this sensitivity occurs exclusively when LPS is injected into the SN [6].

The COX-2 induction produced by LPS, suggests an increase in oxidative stress in the SN, uncorroborated by motor impairment, which, by it self, can be interpreted as a manifestation of damage in dopaminergic system. Otherwise, the

hypermotility induced by LPS, 3 and 7 days after surgery (Figure 1), could be a compensatory reaction of dopaminergic neurons that survived the lesion.

It is well known that COX-1 is constitutively expressed in nearly all tissues including the brain, in neurons and astrocytes [17]. COX-2, although an inducible protein, is constitutively expressed in only a few tissues including the brain, particularly in neuronal soma, but not in astrocytes, of different regions including the cortex, amygdale, hippocampal formation, and the dorsal horn of the spinal cord [4]. It becomes up-regulated briefly – 1 – 8 h after seizure, trauma, intracerebral hemorrhage, ischemia, or other neurodegenerative diseases [3,38,23,21,12]. Microglial activation can be triggered by pathogenically-modified activation of Central Nervous System (CNS) proteins, antigens from infection agents (such as the gram-negative bacterial cell wall component LPS), prion proteins, or by a complex combination of molecules including ATP, cAMP, interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-10 [15,36]. In this line, there is an increase in reactive microglia in the striatum and SN of patients with idiopathic PD [31,33]. Thus, the brain area that encompasses the SN has the highest density of microglia in the brain [22].

In postmortem, investigations of humans exposed to MPTP, activated microglia have been detected 16 years after the last drug exposure [27]. Activated microglia and dopaminergic cell loss are also found in the SN of primates years after they were treated with MPTP [32]. Moreover, a transient microglial reaction was verified from the 1st until the 14th day in the SN and striatum in mice that received intraperitoneal MPTP injection [24]. These findings suggest that the microglia play an active role in the pathology of PD and may indeed perpetuate the degeneration of dopaminergic neurons once activated [14].

The MPTP-induced model can be considered a good animal model to study the impairment of motor activity associated with Parkinson's disease. This established model has been reproduced in our group with a significant reduction of striatal dopamine levels verified in MPTP-lesioned rats [7,11,34,41]. Our behavioral results corroborate that data, the MPTP group showed motor impairment indicated by a decrease in locomotion and rearing frequency 24 h after surgery (Figures 1

and 2). The maximum COX-2 expression, observed in the SN for the MPTP model, was at 16 h. COX-2 expression is induced specifically within SNpc dopaminergic neurons in human postmortem PD specimens and in the MPTP mouse model of PD during the destruction of the nigrostriatal pathway. It has also been reported that COX-2 ablation and inhibition attenuate MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration [48]. In our results we did not observe any increase in COX-2 expression in the striatum. On the other hand, Przybyłkowska and colleagues [43] demonstrated that MPTP administration in mice, produced a degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons, leading to the increase of COX-2 gene and protein expression in the striatum at 3 and 7 days after MPTP administration but not COX-1. We suggest that this discrepancy in striatal COX-2 expression is probably related to the differences in species and the MPTP doses administered. Nevertheless, these findings provide further evidence that MPTP is a model capable of mimicking the neurochemical and motor impairment found in PD and the neuroinflammatory process, especially 16 h (Figure 7a) after surgery, in our model.

6-OHDA is another neurotoxin capable of inducing regional nigrostriatal degeneration in a topographical pattern very similar to idiopathic PD, when injected into rodents [44]. Intrastriatal administration of 6-OHDA into mice causes microglial cells to activate and increase in number in the SN for the first three days post-injection [39].

The present results for the 6-OHDA-induced model demonstrated severe motor impairment indicated by the decrease in locomotion (24h, Figure 1) and rearing (24 h, 3 and 7 days, Figure 2) frequencies. Besides this, 6-OHDA-injected animals showed increases in latency time (24 h, 3 and 7 days, Figure 3) and immobility time (24 h and 3 days, Figure 4). We also demonstrated an acute up-regulation of COX-2 protein, which occurred in the SN, as early as 4 h after surgery, continuing until the time point 24 h (Figure 8a). On the other hand, the striatum did not show induction of the COX-2 protein throughout the time points analyzed.

Increased expression of COX-2 in microglial cells has been reported in parkinsonian patients suggesting that COX-2 mediated toxic events may play a role in dopaminergic degeneration in PD [46].

In summary, we suggest that LPS can be considered a neuroinflammatory model of PD in terms of the up-regulation of COX-2 few hours after exposure. Otherwise, LPS was surprisingly unable to replicate the motor impairment, which is the strongest characteristic of this disease. On the other hand, the MPTP model mimics the motor impairment and the neuroinflammatory response elicited by COX-2 16 h after the insult, thus proving it to be adequate as an initial phase model of PD. Although, 6-OHDA produced a longer COX-2 induction (4-24 h after surgery) compared to LPS and MPTP, suggesting a stronger neuroinflammatory reaction elicited by that neurotoxin. 6-OHDA demonstrated to be a good model in terms of behavior and neuroinflammatory process. We suggest that the MPTP model corresponds to an acute effect on the dopaminergic system, like the 6-OHDA model. Nitric oxide (NO) is involved in MPTP toxicity and that modifies α -synuclein and parkin in PD brains suggest that NO plays an important role in the pathogenesis of PD [49]. It is also to be considerable that changes in NO levels or nitric oxide synthase (NOS) expression have been described following the administration of the related neurotoxins [42,28,13,19,1].

The SN was far more sensitive, in terms of COX-2 up-regulation than the striatum for all neurotoxins evaluated. Nevertheless, immunoblot analysis of TH did not revealed reductions of TH-content in striatum, for the groups lesioned with the neurotoxins tested. On the other hand, the TH-content of SN was significant reduced for the groups lesioned with the same neurotoxins (data not shown). It is indicating that neurotoxins tested, according to this protocol, only can produce a small nigral lesion. Intranigral infusion of 6-OHDA causes a more pronounced loss of dopaminergic cells than MPTP, the 6-OHDA-lesioned rats did not present a proportional degree of striatal dopamine depletion [9]. In fact, these results correspond with the absence of induction of COX-2 in the striatum.

In conclusion, we observed different patterns of COX-2 induction in the SN when distinct models of PD were tested. All neurotoxins tested produced a

maximal COX-2 expression between 8-16 h after surgery. That time dependent induction appear to be relatively constant in these models, which by itself, is significant considering the importance of neuroinflammatory process in PD.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and CAPES (Brazil). The authors wish to express their sincere gratitude to Dr. Cláudio da Cunha for kindly supplying 6-OHDA, and Dr. Aleksander R. Zampronio for providing LPS. The authors would like to thank Mrs. Silvia N. C. Gennari for her capable technical assistance. SMZ, ST and MABFV are recipient of CNPq fellowships.

References

- [1] Arimoto T, Bing G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2003;12: 35-45.
- [2] Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* 1998;71: 1635–1642.
- [3] Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 1996; 390: 165-169.
- [4] Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; 355: 296-315.
- [5] Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk, HJ, Experiments in Personality: Routledge and Kegan Paul 1960; 52–71.

- [6] Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Lipopolyssaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 1998;70: 1584-1592.
- [7] Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MABF, Miyoshi E, et al. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001;124: 9– 18.
- [8] Dawson TM, Mandir AS, Lee MK. Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 2002;35: 219-222.
- [9] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005 in press.
- [10] Fewng Z-H, Wang T-G, Li D-D, Fung P, et al. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett* 2002;329: 354– 358.
- [11] Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, et al. L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001;4: 361-370.
- [12] Gong C, Ennis SR, Hoff JT, Keep RF. Inducible cyclooxygenase-2 expression after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 2001;901: 38-46.
- [13] Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 262-273.

- [14] Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Experimental Neurology* 2005 in press.
- [15] Hanish UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002;40: 140-155.
- [16] Herrera AJ, Castaño A, Venero JL, Cano J, Machado A. The Single Injection of LPS as a New Model for Studying the Selective Effects of Inflammatory Reactions on Dopaminergic System. *Neurobiology of Disease* 2000;7: 429-447.
- [17] Hewett SJ, Ulasz TF, Vidwans AS, Hewett JA. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293: 417-425.
- [18] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, van Elk E-J, et al. The role of cyclooxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E₂ secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* 2002;951: 218–226.
- [19] Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* 2002;110: 49-58.
- [20] Johnson N, Leone F. *Statistic and experimental design*. Engineering and Physical Sciences Wiley, 1974 New York.
- [21] Kim EJ, Lee JE, Know KJ, Lee SH, et al. Differential roles of cyclooxygenase isoforms after kainic acid-induced prostaglandin E₂ production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures. *Brain Res* 2001;908: 1-9.

- [22] Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 2000; 20: 6309-6316.
- [23] Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: NOS-2, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000;6: 724-739.
- [24] Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, et al. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 1998;39: 167-180.
- [25] Kurkowska-Jastrzebska I, Babiuch M, Joniec I, Przybylowski A, et al. Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *Int Immunopharmacol* 2002;2: 1213– 1218.
- [26] Lang A, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339: 1044–1053.
- [27] Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 1999;46: 598-605.
- [28] Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, MacAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Nat Med* 1999;5: 1403-1409.

- [29] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin protein reagent. *J Bio Chem* 1951;193: 265–275.
- [30] Madrigal JLM, Moro MA, Lizasoian I, Lorenzo P, et al. Induction of Cyclooxygenase-2 Accounts for Restraint Stress-Induced Oxidative Status in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology* 2003;28: 1579-1588.
- [31] McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988;38: 285-1291.
- [32] McGeer PL, Swab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol* 2003;54: 599-604.
- [33] Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2000;95: 425-432.
- [34] Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplesse M, Silveira R. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Res Bull* 2002;58: 41-47.
- [35] Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Thomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res* 2000; 864: 281–290.
- [36] Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 2002;25: 945-953.

- [37] Nakayama M, Chen J, Lowry T, Asakura T. The immediate early gene cyclooxygenase is expressed in CA1 neurons destined for apoptotic cell death following global ischemia. *Abstr Soc Neurosci* 1995; 21: 1268.
- [38] Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 10966-10971.
- [39] Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2002;68: 325-340.
- [40] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second ed. Academic Press, 1986 San Diego.
- [41] Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, Vital MABF. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. *European Journal of Pharmacology* 2004;484: 225-233.
- [42] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 4565-4571.
- [43] Przybylowska A, Kurkowska-Jastrzebska I, Joniec I, Ciesielska A. Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Research* 2004;1019: 144-151. 2004.

[44] Rodriguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, Obeso J, Gonzalez-Hernandez T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease. *Exp. Neurol* 2001;169: 163-181.

[45] Scali, C, Prosperi C, Vannucchi MG, Pepeu G, et al. Brain inflammatory reaction in animal model of neuronal degeneration and its modulation by an anti-inflammatory drug: implication for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2000;12: 1900– 1912.

[46] Teismann P, and Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 2001;39: 167–174.

[47] Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100: 5473–5478.

[48] Wyss-Coray T, and Mucke L. *Nat Med* 2000; 6: 973–974.

[49] Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacology and Therapeutics* 2005 in press.

|

Legend to figures

Fig. 1. Locomotion frequency of rats treated with intranigral LPS, MPTP and 6-OHDA, and evaluated in an open-field. The values represent mean \pm S.E.M. for 10 animals in each group. ★, $P < 0.05$ compared to the non-operated group; ★★, $P < 0.01$ compared to the non-operated group; ★★★, $P < 0.001$ compared to the non-operated group. Two way ANOVA followed by the Tukey test.

Fig.2. Rearing frequency of rats treated with intranigral LPS, MPTP and 6-OHDA, and evaluated in an open-field. The values represent mean \pm S.E.M. for 10 animals in each group.★, $P < 0.05$ compared to the non-operated group; ★★, $P < 0.01$ compared to the non-operated group. Two way ANOVA followed by the Tukey test.

Fig. 3. Latency (s) in initiating movement of rats treated with intranigral LPS, MPTP and 6-OHDA, and evaluated in an open-field. The values represent mean \pm S.E.M. for 10 animals in each group. ★★★, $P < 0.001$ compared to the non-operated group. Two way ANOVA followed by the Tukey test.

Fig. 4. Immobility time (s) of rats treated with intranigral LPS, MPTP and 6-OHDA, and evaluated in an open-field. The values represent mean \pm S.E.M. for 10 animals in each group. ★, $P < 0.05$ compared to the non-operated group; ★★★, $P < 0.001$ compared to the non-operated group. Two way ANOVA followed by the Tukey test.

Fig. 5. Immunoblot analyses of COX-2 and COX-1 expressions after Sham surgery. **a**, Substantia nigra. **b**, striatum. Cell extracts from SN or striatum were prepared at the indicated time points. A representative immunoblot for each tissue is shown. The values represent the mean \pm S.E.M. for 3 animals in each time point. No significant differences were observed between groups.

Fig. 6. Immunoblot analyses of COX-2 and COX-1 expressions after LPS surgery. **a**, Substantia nigra. **b**, striatum. Cell extracts from SN or striatum were prepared at the indicated time points. A representative immunoblot for each tissue is shown.

The values represent the mean \pm S.E.M. for 3 animals in each time point. ★, $P < 0.05$ compared to the non-operated group; ★★, $P < 0.01$ compared to the non-operated group. ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Fig. 7. Immunoblot analyses of COX-2 and COX-1 expressions after MPTP surgery. **a**, Substantia nigra. **b**, striatum. Cell extracts from SN or striatum were prepared at the indicated time points. A representative immunoblot for each tissue is shown. The values represent the mean \pm S.E.M. for 3 animals in each time point. ★, $P < 0.05$ compared to the non-operated group. ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Fig. 8. Immunoblot analyses of COX-2 and COX-1 expressions after 6-OHDA surgery. **a**, Substantia nigra. **b**, striatum. Cell extracts from SN or striatum were prepared at the indicated time points. A representative immunoblot for each tissue is shown. The values represent the mean \pm S.E.M. for 3 animals in each time point. ★★, $P < 0.01$ compared to the non-operated group. ★★★, $P < 0.001$ compared to the non-operated group. ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Figures

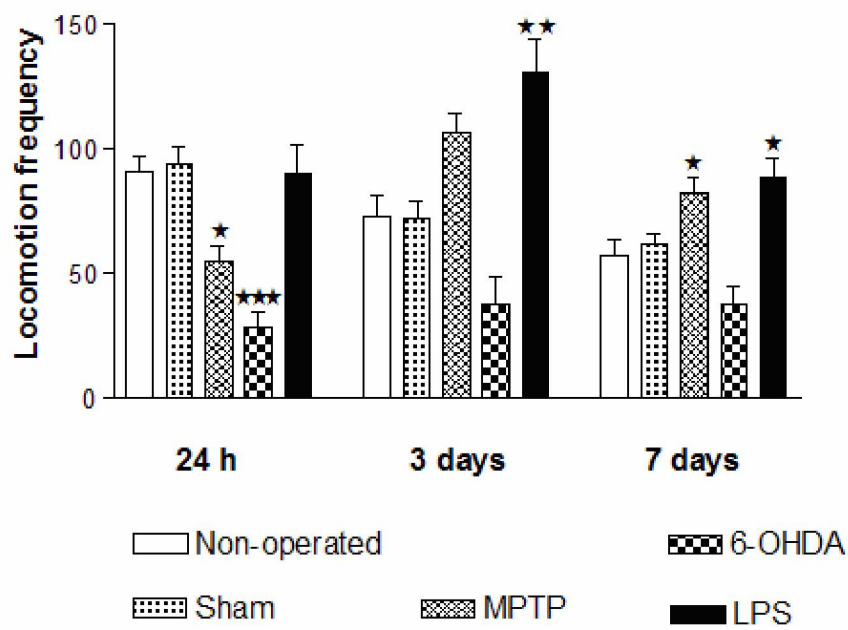


Figure 1.

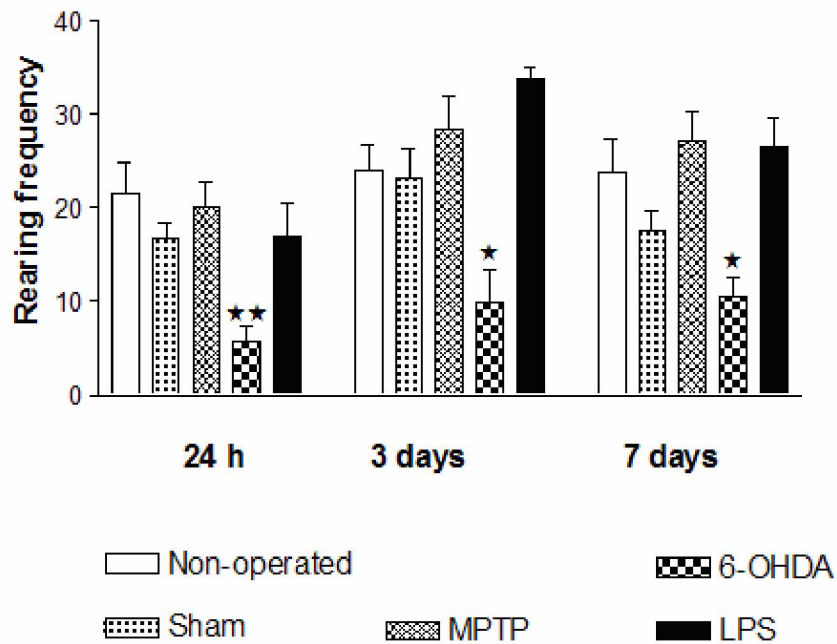


Figure 2.

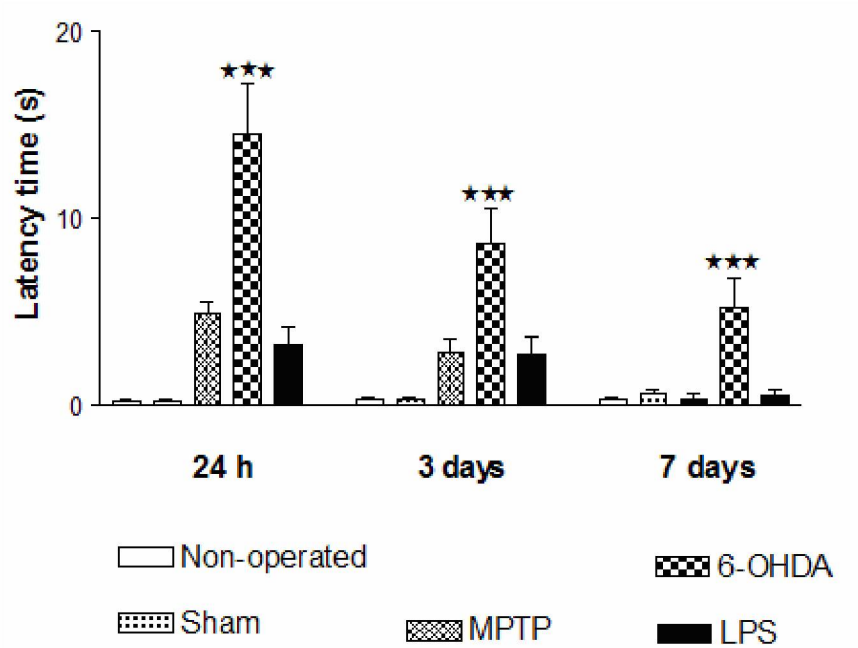


Figure 3.

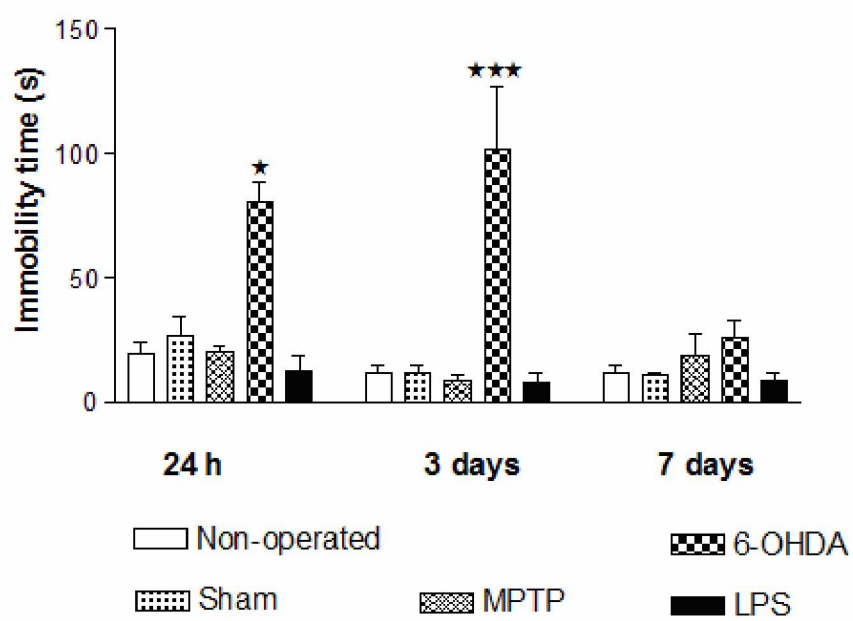


Figure 4.

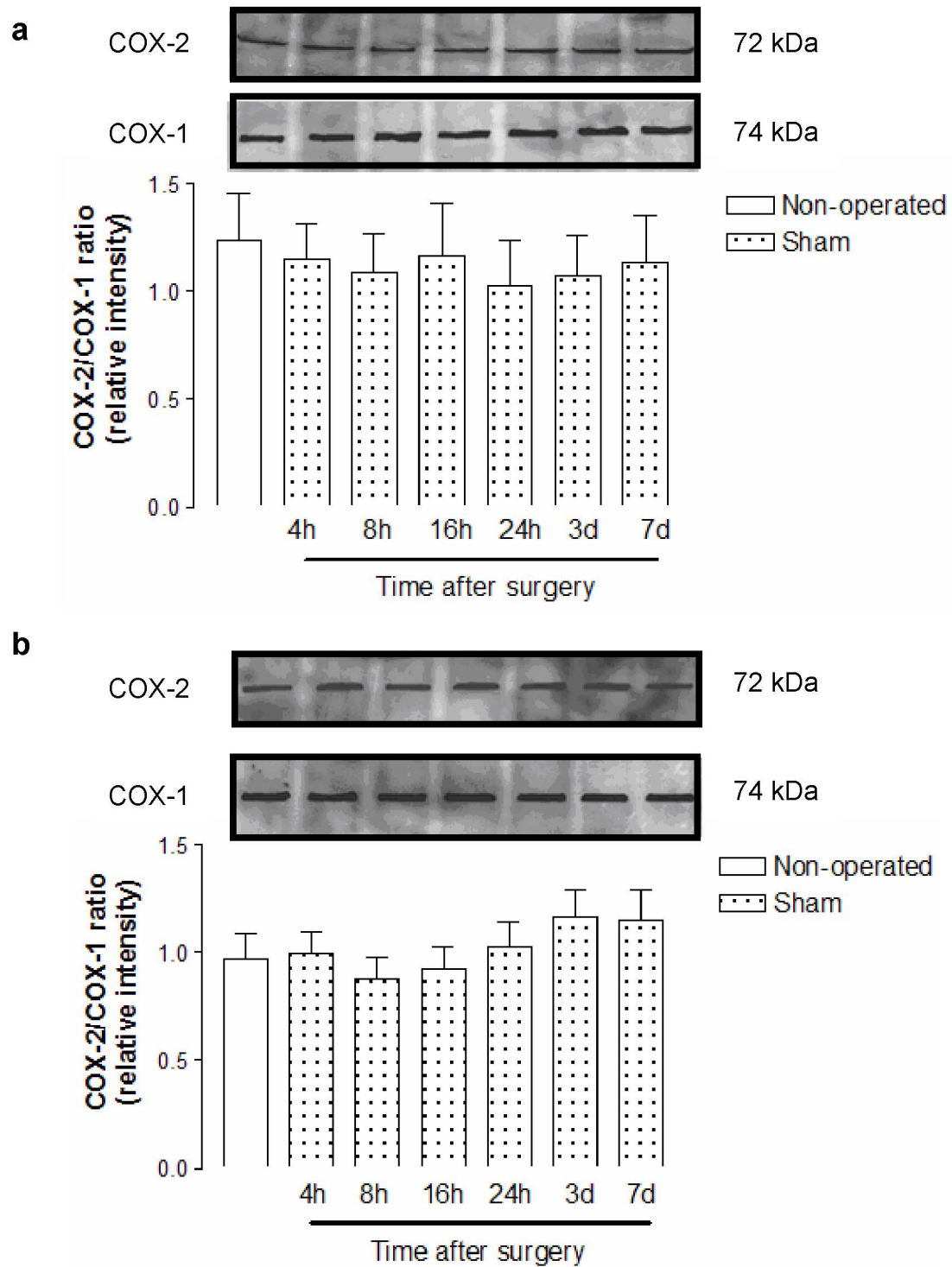


Figure 5.

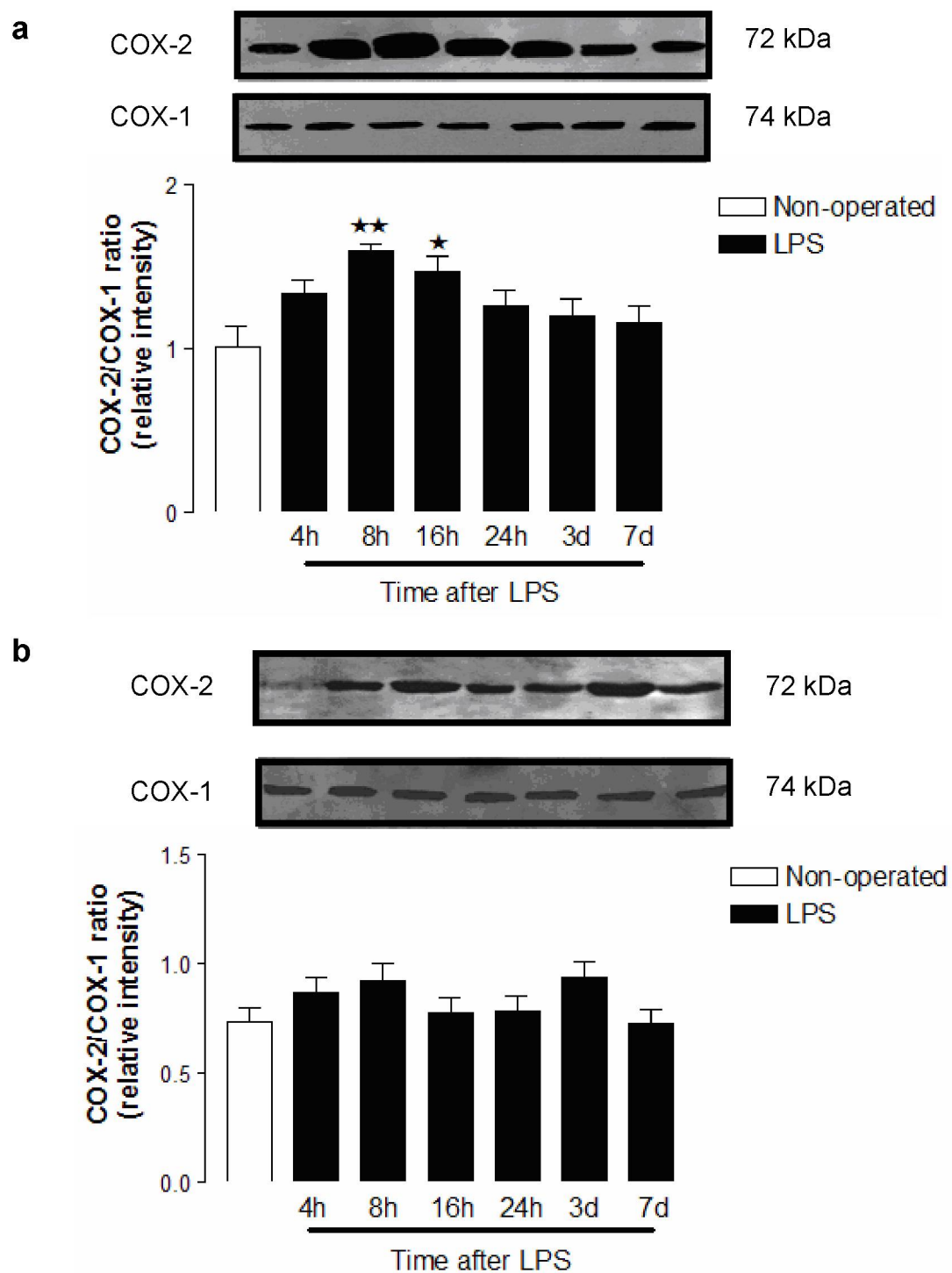


Figure 6.

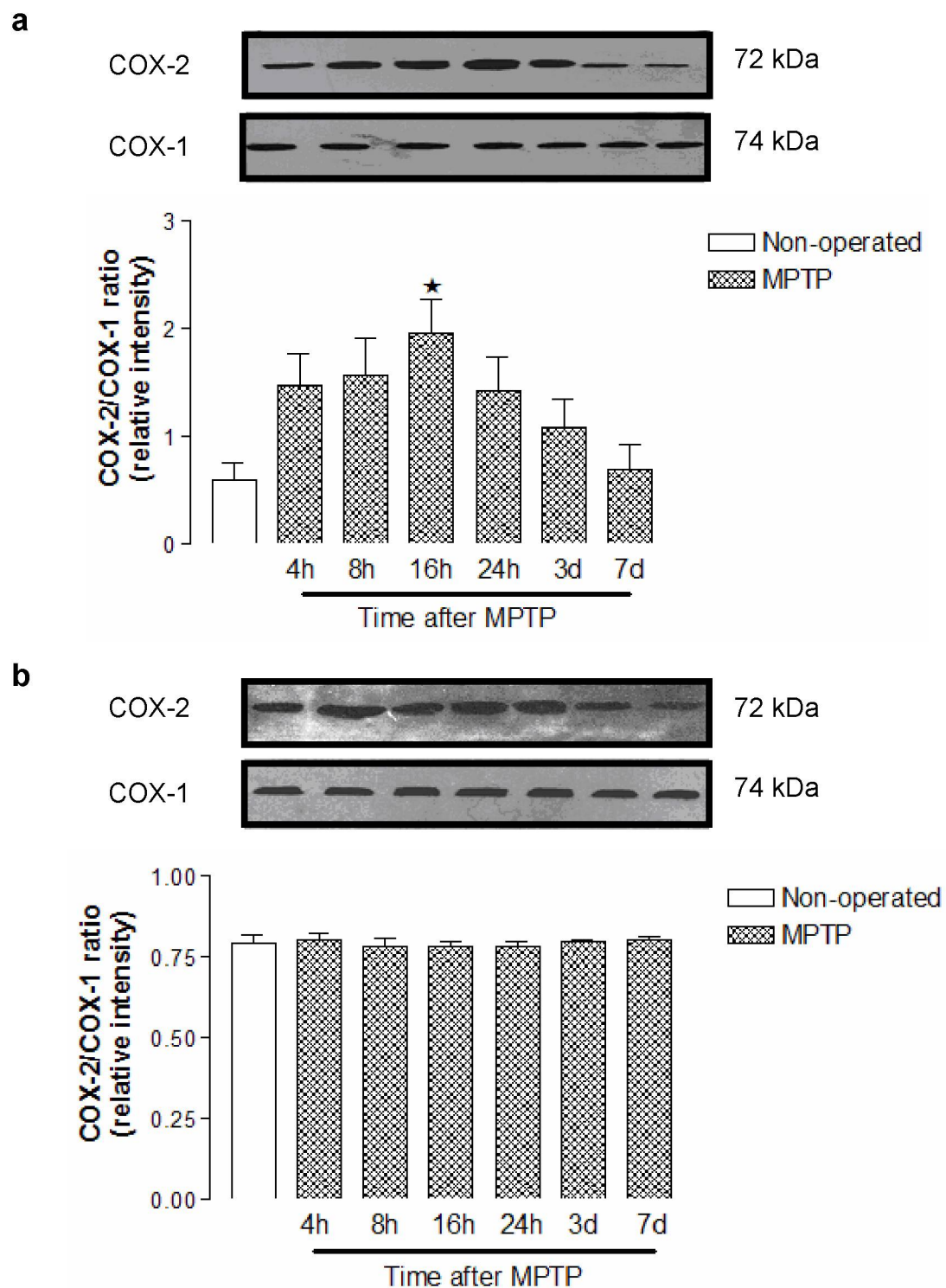


Figure 7.

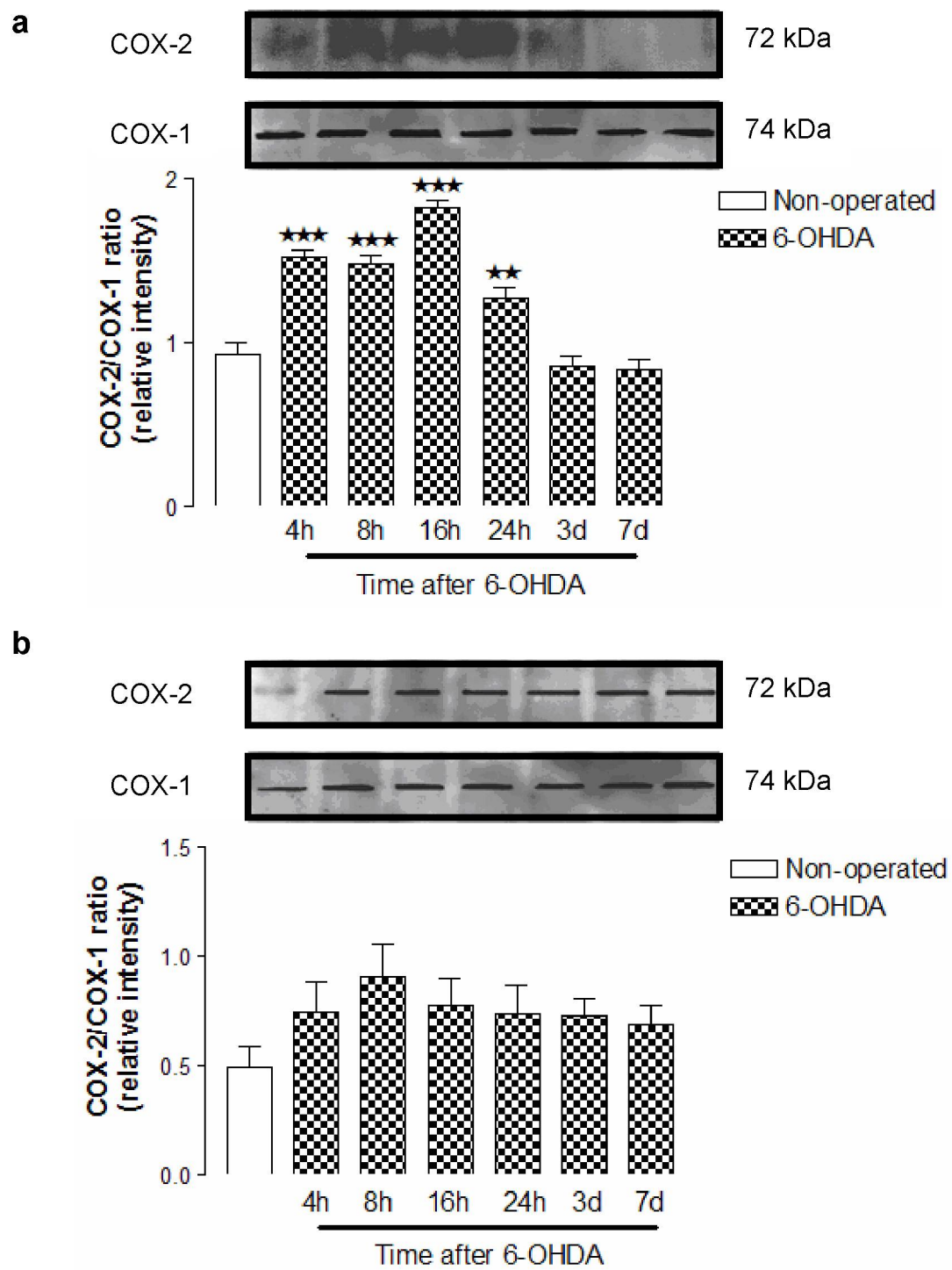


Figure 8.

COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats

Angela Reksidler Braga¹, Marcelo de Meira Santos Lima¹, Sílvio Marques Zanata²,
Hidevaldo Bueno Machado^{1†}, Cláudio da Cunha¹, Roberto Andreatini¹, Sergio
Tufik³ and Maria A. B. F. Vital^{1†}

(4) Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;

(5) Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;

(6) Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil;

†Corresponding Author

Dr. Maria A. B. F. Vital

Universidade Federal do Paraná

Setor de Ciências Biológicas

Departamento de Farmacologia

Av. Francisco H. dos Santos s/n

CEP: 81.531 – 990

Caixa Postal: 19031

Curitiba – Paraná – Brasil

FAX number: 0055-041-266 2042

0055-041-361 1720

E-mail: vital@ufpr.br

‡ Present address: Department of Molecular and Medical Pharmacology,
University of California - Los Angeles, USA.

Abstract

The present study investigated the potential of parecoxib (Bextra™), a selective COX-2 inhibitor, to prevent motor and cognitive impairments observed in rats after an intranigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a model of the early phase of Parkinson's disease. The treatment with parecoxib 10 mg/kg given before the surgery and 2 mg/kg daily for the subsequent 21 days, prevented the MPTP-treated rats from presenting decreased locomotor and exploratory behavior, increased immobility, and impairment while performing the cued version of the Morris water maze. Furthermore, parecoxib treatment also significantly prevented the reduction of tyrosine hydroxylase protein content in the substantia nigra pars compacta (7, 14 and 21 days after surgery), and in the striatum (14 and 21 days after surgery) as immunorevealed by western blotting. These results strongly suggest a neuroprotective effect of parecoxib that reflect in the motor and cognitive impairments of this animal model of the early phase of Parkinson's disease.

Keywords: parecoxib, MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), TH (tyrosine hydroxylase), COX-2 (cyclooxygenase-2), Parkinson's disease.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's dementia (Przedborski, 2005). The cardinal clinical manifestations of Parkinson's disease include bradykinesia, rest tremor, rigidity, gait abnormalities and postural instability. These symptoms may be accompanied by autonomic dysfunction, as well as psycho-organic disturbances, such as depression, slowness of affect (Birkmayer and Riederer, 1985; Valldeoriola *et al*, 1997), and occasionally prominent dementia in the early stages of the illness (Birkmayer and Riederer, 1985; Valldeoriola *et al*, 1997; Calne, 2001). The main pathological characteristic of PD is the loss of pigmented dopamine (DA)-containing neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) associated with the presence of cytoplasmic α -synuclein positive inclusions (Lewy bodies) (Hassler, 1938; Hornykiewicz, 1966). Parkinsonian signs appear when neuronal death exceeds a critical threshold: 70-80% of DA nerve terminals in the striatum and 50-60% of SNc DA perikarya (Meissner *et al*, 2004).

To understand the pathophysiology of PD, and to develop novel therapies for improved symptomatic management, it is important to have relevant disease models of PD, in which new pharmacological agents and treatment strategies can be assessed before clinical trials are initiated (Beal, 2001; Betarbet *et al*, 2002). MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) was discovered in 1982, when a group of drug addicts developed sub-acute severe parkinsonism. The syndrome was caused by self-administration of a synthetic heroin analog that had been contaminated by MPTP (Langston *et al*, 1983; Ballard *et al*, 1985), which is highly lipophilic and readily crosses the blood-brain barrier. MAO-B (monoamine oxidase-B) in glial cells converts MPTP to MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) (Chiba *et al*, 1984), which is taken up via the neuronal dopamine transporter (DAT) and accumulates in dopaminergic neurons (Gainetdinov *et al*, 1997). Mice that lack this transporter are protected from MPTP toxicity. Absorbed MPP⁺ concentrates in mitochondria, where it inhibits complex I of the electron transport chain, thereby reducing ATP generation and causing the production of ROS (reactive oxygen

species), inducing apoptotic death of dopaminergic neurons (Kitamura *et al*, 2003; Speciale, 2002). MPTP is the most widely used and the best investigated model of Parkinson's disease (Gerlach and Riederer, 1996).

Numerous neurochemistry studies have shown that MPTP administration predominately damages the nigrostriatal pathway, causing cell loss in the substantia nigra (Heikkila *et al*, 1984; Sundström *et al*, 1987; German *et al*, 1996; Gevaerd *et al*, 2001) and dopamine depletion in the neostriatum (Sonsalla and Heikkila, 1986; Sundström *et al*, 1987; Da Cunha *et al*, 2001) mimicking in animals the neurochemical alterations observed in Parkinson's disease. In most of these studies, a decrease in locomotion and/or rearing was observed following MPTP administration (Sedelis *et al*, 2001).

Evidence from human and animal models of PD has suggested an important role for neuroinflammation in the pathogenesis of the disease. COX-2 expression is induced specifically within SNpc (substantia nigra pars compacta) dopaminergic neurons in postmortem PD specimens and the MPTP mouse model of PD during the destruction of the nigrostriatal pathway (Teismann *et al*, 2003).

Inflammation is the first line of defense against an infection, however, an excessive inflammatory response can also be a source of additional injury to host cells (Wyss-Coray and Mucke, 2002). The brain has a relatively low adaptive immune response, but is vulnerable to innate immune reactions. Neurons, as a result of a lack of ability to divide and little ability to recover from injury, are extremely vulnerable to auto destructive immune and inflammation processes (Compston, 1995; Carson and Sutcliffe, 1999). Inflammation has also been implicated in the neurodegenerative process in animal models of PD, such as MPTP. Inactivation of genes involved in inflammation such as those encoding COX-2 (Feng *et al*, 2002), NADPH oxidase (Wu *et al*, 2003) and both TNF- α receptors (Sriram *et al*, 2002) protects dopamine-containing neurons against MPTP-induced neurotoxicity, indicating that inflammation is an important component of the MPTP-mediated neurodegenerative process (Gao *et al*, 2003). The inhibition of COX-2 alone or both COX-1 and 2, by some selective and non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the various models of

neural injury, was shown to provide a neuroprotective effect (Aubin *et al*, 1998; Kurkowska-Jastrzębska *et al*, 2002; Mohanakumar *et al*, 2000; Nakayama *et al*, 1998; Scali *et al*, 2000).

COX-2 is strongly suggested to play a detrimental role in neurodegeneration and stimulation of an inflammatory process following neuronal death. Through prostaglandin production and pro-inflammatory mechanisms and by ROS formation, COX-2 may aggravate the degenerative process (Hoozemans *et al*, 2002; Teismann *et al*, 2003). It has been shown that COX-2 expression in neurons correlates with apoptosis and is involved in neuronal response to stress (Nakayama, 1995).

In some experiments, pretreatment with NSAIDs such as: indomethacin (Kurkowska-Jastrzębska *et al*, 2002), acetaminophen, aspirin (Maharaj *et al*, 2004), rofecoxib (Teismann *et al*, 2003), dexamethasone (Kurkowska-Jastrzębska *et al*, 2004) led to partial or total protection against MPTP toxicity, demonstrating good perspectives for new therapeutic approaches.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the possible neuroprotective effect of parecoxib in rats that received intranigral infusions of MPTP performing general activity test, water maze task cued test version and TH-immunodetection.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from our colony weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. The rats were maintained in a temperature controlled room ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12 h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.) with free access to food and water. All the behavioral experiments were conducted between 2:00 and 6:00 p.m. The animals used in this study were maintained and handled in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

2.3. Procedures

The rats were divided at random and equally into the following groups: control+saline, control+parecoxib, sham+saline, sham+parecoxib, MPTP+saline and MPTP+parecoxib. All the groups received intraperitoneal injections of saline or parecoxib (Bextra™, Pfizer, was freshly prepared by dissolving it in saline) one hour before surgery (10mg/kg) and daily (2 mg/kg) until the end of the tests.

Experiment 1 – Effects of parecoxib in MPTP-lesioned rats in the general activity test

To determine changes in motor behavior we choose the open field as a test of general activity. Sixty rats distributed in groups: control+saline (n =10), control+parecoxib (n = 10), sham+saline (n = 10), sham+parecoxib (n =10), MPTP+saline (n =10) and MPTP+parecoxib (n =10), which performed the test 24 h, 7, 14 and 21 days after surgery.

Experiment 2 – Effects of parecoxib on water maze task, cued test version

To verify memory alterations we performed the water maze task, cued test version, starting one week after surgery until the 18th day after surgery. Sixty rats distributed in the following groups were used: control+saline (n =10), control+parecoxib (n = 10), sham+saline (n = 10), sham+parecoxib (n =10), MPTP+saline (n =10) and MPTP+parecoxib (n =10).

Experiment 3 – Effects of parecoxib on TH protein expression

To detect the presence of TH and its possible fluctuations in the SN and striatum, after neurotoxin injection and during the parecoxib treatment, we used three different rats per group in a triplicate assay. Tissue samples were obtained 24 h, 7, 14 and 21 days after surgery.

2.4. Stereotaxic Surgery

All the operated rats received atropine sulphate (0.4 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) and penicillin G-procaine (20.000 U in 0.1 ml, intramuscular) and were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg). MPTP-HCl, (100 µg in 1 µL of saline; Sigma, St. Louis, MO, USA) was bilaterally administered through a 30-gauge stainless needle at a rate of 0.33 µl/min, for 3 min followed by 2 min post injection for diffusion of the MPTP, according to the following coordinates: anteroposterior (AP): - 5.0 mm from bregma; mediolateral (ML): \pm 2.1 mm from midline; dorsoventral (DV): - 7.7 mm from skull, adapted from Paxinos and Watson (1986). Sham operations followed the same procedure but 1µL aCSF instead of MPTP was injected bilaterally into the SNpc. The composition of the aCSF was as follows: 8.66 g NaCl, 0.205 mg KCl, 0.176 g CaCl₂.2H₂O and 0.173 g MgCl₂.6H₂O in 1 L water.

2.4. General activity test

The general activity test was performed in an open-field constructed according to Broadhurst (1960). The testing arena was round with a diameter of 97 cm. The circular wall was 32.5 cm high and was constructed of aluminum sheeting. The arena was situated on a wood floor. The floor and the wall were painted white. The arena floor was divided into three concentric circles. The small inner circle had a diameter of 23 cm; the second circle had a diameter of 61 cm and the arena wall defined the outer circle. Each circle was divided into essentially equal sized areas. The number of areas in the inner circle, middle and outer circles was 1, 6 and 12, respectively. A 100-W ceiling light was situated 48 cm above the arena floor. Cheesecloth was draped from the ceiling and dropped outside the arena wall. The cloth served to diffuse the light and functioned as a one-way screen. The rats were observed individually for 5 min and the different groups were inter-mixed; observations started at 8.00 a.m. and the animals were tested in the same order every day. Hand-operated counters were used to score locomotion frequency

(number of floor units entered), rearing frequency (number of times the rats stood on their hind legs), immobility time (number of seconds of lack of movement during testing) and latency time (time taken to initiate movement). The apparatus was washed with a water–alcohol (5%) solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

2.5. Memory task

The water maze apparatus consisted of a round tank 170 cm in diameter and 50 cm high and with a water depth of 32 cm. The water temperature was maintained at 22°C. The four starting positions were located at the intersections of imaginary quadrants (northwest-NW, northeast-NE, southwest-SW and southeast-SE). Several distal cues were placed on the walls of the water maze room. During the experiments, the tank was videotaped and the scores for the latency in reaching the escape platform, the swimming speed, and the swimming paths were computed online by an image analyzer (2020 Plus tracking System - HVS Image, UK).

The rats were submitted to a cued test version of the water maze that models a stimulus-response habit learning (implicit memory) known to be affected in Parkinson's disease patients (Knowlton *et al*, 1996). This test consisted of 11 days training with four consecutive trials per day, during which the rats were left in the pool facing the wall, and allowed to swim freely to a transparent acrylic platform (11 x 14 cm) submerged 2 cm below the water surface. The platform was placed in the center of one of the four quadrants in the tank. All trials were terminated when the rat found the platform or after a maximum period of 60 s, when the animal was gently guided to the platform.

The platform had a cue consisting of 7-cm diameter white ball attached to the top of the platform and protruding above the water. Furthermore, the position of the platform was always changed in each trial of the day. After the rat escaped to the platform, it was allowed to remain on it for 20 s and was then removed from the tank for 30 s before being placed in the next random initial position (Miyoshi *et al*,

2002). Therefore, the rats could find the platform only by associating the visual cue with the position of the hidden platform.

2.6. TH-immunodetection by western blotting

The rats were killed by decapitation and their brains were quickly dissected. The SN and striatum are immediately frozen in liquid nitrogen until the lysis procedure performed in a 1.5 mL Eppendorf tube by sonication in presence of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 20 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and protease inhibitors (Complete tablet; Roche, Indianapolis, IN). After incubation on ice for 30 min extracts were centrifuged at 10 000 g for 20 min at 4°C, and the supernatants for protein extracts were collected and stored at -80°C for further analysis. Protein concentrations were measured by the Lowry method (Lowry *et al*, 1951). Protein samples containing equal amounts of protein (30 μ g per lane) were boiled with SDS sample buffer and loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to PVDF membranes. Each membrane was blocked for 1 h with 10% nonfat dry milk/0.5% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBST).

The membranes were probed overnight at 4°C with mouse monoclonal antibodies specific to TH (1:2 000; Sigma, St. Louis, MO, USA). After several washes in TBST the membranes were incubated with IgG horseradish peroxidase-conjugated (1:5 000; Amersham) for 60 min and visualized by chemiluminescent substrate (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Each gel contained lanes from all groups. The bands were quantified by using the software ImageJ 1.32j public domain (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.7. Statistical analysis

For analysis of variance, the Bartlett test (Johnson and Leone, 1974) was applied to the open field data. It was concluded that all the results were parametric. Thus, two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was

employed to detect differences between the two factors analyzed, treatments and time. For open field and water maze task data, the Tukey test was used as post hoc when it was indicated by ANOVA. Western blotting data were analyzed by ANOVA and the Newman-Keuls test. Differences were considered significant if $P < 0.05$. The values were reported as mean \pm S.E.M.

3. Results

Experiment 1 – Effects of parecoxib in MPTP-lesioned rats in the general activity test

Table 1 presents the scores of all groups tested in the open field test 24 h, 7, 14 and 21 days after surgery. The results indicated that 24 h after the infusion of the neurotoxin, MPTP+saline rats exhibited a significant decrease in locomotion in comparison to the control groups (control+saline, control+parecoxib, sham+saline and sham+parecoxib) ($F(5,47) = 12.29$; $P < 0.0001$). In addition, 7 and 14 days after the MPTP lesion, MPTP+saline treated rats showed a significant increase in locomotion when they were compared to the control groups ($F_{7\text{days}}(5,50) = 3.54$; $P = 0.008$) ($F_{14\text{days}}(5,44) = 4.01$; $P = 0.0044$). Twenty one days after the lesion this group presented no differences from the others. Surprisingly the MPTP+parecoxib rats showed a significant increase in locomotion when this group was compared with all groups 24h after surgery ($F(5,47) = 12.29$; $P < 0.05$). These MPTP+parecoxib animals also showed a significant increase in locomotion frequency 21 days after the MPTP infusion, in comparison to control+saline and control+parecoxib rats ($F(5,41) = 3.63$; $P = 0.0082$).

Rearing frequencies 24 h after surgery indicated that MPTP+saline rats presented a significant reduction in this motor sign only in comparison with the control+parecoxib group ($F(5,50) = 3.066$; $P = 0.0172$). In contrast, MPTP-lesioned rats showed an increase in rearing in the session performed 7 days after the surgery when this group was compared to control+saline ($F(5,49) = 2.60$; $P = 0.0362$). Prior long-term treatment with parecoxib did not change the rearing

behavior in the control nor in the MPTP-lesioned rats. Fourteen and 21 days after the surgery there was no difference between the groups.

The immobility time 24 h after surgery for MPTP+saline rats exhibited no statistical difference from control rats but showed a significant increase in immobility time in comparison to the MPTP+parecoxib group ($F(5,46) = 4.43$; $P = 0.0022$). Moreover, in the session of observation performed 7 days after surgery, the MPTP+saline group showed a decrease in this parameter when compared to control+saline and sham+saline ($F(5,45) = 3.43$; $P = 0.0102$). However, 14 days after the lesion, both groups of MPTP-lesioned rats presented a decrease compared to the control+saline group ($F(5,44) = 4.28$; $P = 0.0029$). Finally, 21 days after surgery only the rats of the MPTP+parecoxib group showed a reduction in immobility time when compared to control+saline rats ($F(5,39) = 2.97$; $P = 0.022$).

Experiment 2 – Effects of parecoxib on water maze task, cued test version

As can be seen in figure 1, the learning of the cued task can be deduced by the significant and progressive reduction in the latency in finding the cued platform ($F(11,224) = 235$, $P < 0.0001$ – day factor). MPTP-lesioned rats took significantly longer latency times to find the platform from the 4th day to the 9th training days and this effect was prevented by the parecoxib treatment ($F(11,191) = 202$, $P < 0.0001$ – treatment factor; $P < 0.05$, post-hoc Tukey test). Figure 2 presents representative trajectories of each group (a: control+saline; b: control+parecoxib; c: Sham+saline; d: Sham+parecoxib; e: MPTP+saline; f: MPTP+parecoxib) during the 4th day of training in the water maze task cued test version.

Experiment 3 – Effects of parecoxib on TH protein expression

The western blotting analyses of SN revealed a significant reduction of 30% in the TH-content of the MPTP+saline ($P < 0.05$) and 20% for MPTP+parecoxib ($P < 0.05$) groups 24 h after surgery (figure 3a). The sham group did not exhibit any difference in the TH-content in comparison with control+saline group. Striatum

response, 24 h after surgery, showed an absence of TH ablation for both the MPTP+saline and MPTP+parecoxib groups in comparison to the control+saline group (figure 3b).

As can be seen in figure 4a, the MPTP+saline group presented a significant reduction ($P<0.05$) of 20% in TH-content, in comparison with the control+saline group in the SN 7 days after surgery. The MPTP+parecoxib group exhibited no difference in comparison to the control+saline group. Figure 4b shows the same analysis realized in the striatum. No differences in TH content were observed among the groups.

The data presented in figures 5a and 5b revealed a significant reduction ($P<0.05$) of 26% and 24% in TH-content for the MPTP+saline group 14 days after surgery, in comparison with the control+saline group, observed in SN and striatum tissues respectively. The MPTP+parecoxib group exhibited no difference in comparison with the control+saline group for both SN and striatum, 14 days after surgery.

As can be seen in figures 6a and 6b, the MPTP+saline group presented a significant reduction ($P<0.05$) of 28% and 20% in TH-content 21 days after surgery in comparison with the control+saline group, observed in SN and striatum tissues respectively. The MPTP+parecoxib group exhibited no difference in comparison with the control+saline group for both SN and striatum, 21 days after surgery.

4. Discussion

Our data are in agreement with previous studies showing that the infusion of MPTP into the SNpc can be considered a good animal model for studying the impairment of motor activity and the early memory impairment associated with Parkinson's disease. Thus, this established model is reproduced in our group with a significant reduction of striatal dopamine levels and a pronounced loss of dopaminergic cells, verified in MPTP-lesioned rats (Da Cunha *et al*, 2001; Gevaerd *et al*, 2001; Miyoshi *et al*, 2002; Perry *et al*, 2004; Ferro *et al*, 2005).

The bilateral intranigral injection of this neurotoxin produced a reduction in locomotion ($P<0.05$) and rearing ($P<0.05$) performances of the rats in the open field observed 24 h after surgery. This hypokinesia is an important feature of this model which has face validity with PD. Moreover, the result suggests that the lesion probably produced significant destruction in the dopaminergic neurons of the SNpc, which was correlated with a reduction in the TH expression in this region 24 h, 7, 14 and 21 days after the MPTP infusion in MPTP+saline rats. In addition, we also observed a hypermotility for the MPTP+saline group at 7 and 14 days after surgery, which could be considered as a dopaminergic adaptative response to the lesion. This fact can be seen behaviorally by the increase ($P<0.05$) in locomotion frequency, accompanied by a decrease in immobility time ($P<0.05$) at 7 and 14 days after surgery for the MPTP+saline group. This suggests that the rats of this group had an exacerbated dopaminergic response, which returns to normal 21 days after surgery. These data are in agreement with those from Tanila *et al*, (1998) and Perry *et al*, (2004) who demonstrated that MPTP treated mice and rats, respectively, were hyperactive in comparison with their control groups.

In contrast, the MPTP+parecoxib group did not differ from the control rats 24 h, 7 and 14 days after the surgery. This fact is suggestive of a neuroprotective effect of parecoxib. It is a prodrug of valdecoxib, which is a second generation of selective COX-2 inhibitor (Satyanarayana *et al*, 2004), revealed to be an effective way to prevent the hypolocomotion caused by MPTP, 24 h after the lesion and also able to interfere in other parameters commonly impaired by MPTP-lesion, such as rearing and immobility, at 24 h, 7, 14 and 21 days after surgery. Seven and 14 days after the surgery, this group did not differ from the control group in any of the parameters observed in an open-field. Conversely, 21 days after the MPTP infusion, MPTP+parecoxib exhibited a hyperlocomotion in comparison to the control+saline group. This result could be interpreted such as reduction in habituation to the open-field after prolonged administration of parecoxib. However, the control+parecoxib group showed similar performance to the control rats in this test. Thus, the results of the cued version indicated that parecoxib also presents a protective effect in this memory task.

A bilateral intranigral injection of MPTP produced a reduction in the performance of animals in an active avoidance task (Da Cunha *et al*, 2001; Gevaerd *et al*, 2001; Perry *et al*, 2004), impaired learning in a cued version (Miyoshi *et al*, 2002; Perry *et al*, 2004) and also in a spatial working memory version of the water maze (Miyoshi *et al*, 2002).

The analysis of the latency in finding the platform and trajectories in the cued test showed that the MPTP+saline rats exhibited an increase (4th to 9th days of test) in this parameter in comparison to the control group. The impairment of the ability to perform the cued version of the water maze after MPTP administration in the MPTP+saline group was probably due to lesioning of the dopaminergic pathway, since lesioning of the dorsolateral caudate-putamen is known to impair the ability of rats to perform this task (Packard and McGaugh, 1992; Devan and McDonald, 1999). However, it is noteworthy that on the 10th day after testing these (animals) rats did not differ from control rats, a result similar that found by Miyoshi *et al*, (2002). It is possible that the partial lesioning of the nigrostriatal dopaminergic system when learning the cued task can be compensated for by overtraining, because the performance of the MPTP+saline rats did not differ from control rats by the 10th training day; at the time that MPTP-lesioned rats would have compensated for the deficit caused by striatal dopamine depletion by using alternative processing systems or by using a different strategy to find the cued platform (Miyoshi *et al*, 2002). This effect may also be due to the fact that the lesion is partial. This is a hypothesis that deserves further consideration in future experiments.

Interestingly, the MPTP+parecoxib rats did not differ from the control group with respect to the latency in finding the platform in the cued version of the Morris water maze. Again, this COX-2 inhibitor presented a neuroprotective effect in MPTP-lesioned rats in preserving the memory system related to this task. Moreover, swimming velocity was isolated increased ($P < 0.05$) only for the MPTP+parecoxib group on the 6th training day, in comparison to the control+saline group (data not shown). Data from the literature regarding the effect of parecoxib on the memory are absent. Moreover, the prolonged administration of parecoxib in

the saline+parecoxib group did not differ from the control group in this task. Nevertheless, Sharifzadeh *et al*, (2005) demonstrated that intrahippocampal infusion of the COX-2 inhibitor celecoxib impaired spatial memory retention in the Morris water maze. Bilateral intrahippocampal infusion of celecoxib increased escape latency and travel distance in rats, indicating significant impairment of spatial memory retention. Further systematic studies using the COX-2 inhibitors and memory tasks are necessary to clarify this controversy.

Immunoblotting analyses provide evidence that MPTP provokes a significant reduction of 30% in the TH-content of the SN 24 h after its bilateral infusion. Moreover, 7 days after surgery the MPTP-lesioned rats presented a significant reduction of 20% in the TH-content presented in the SN. Fourteen days after surgery we observed that the MPTP-lesioned rats still presented a significant reduction of 26% in the TH-content of the SN, now also accompanied by a significant reduction of 24% in the TH-content in the striatum. Finally, the last time point observed (21 days after surgery) both the SN and striatum exhibited significant reductions in TH-content, 28% and 20% respectively. Interestingly, only from the 14th to the 21st day after surgery was a significant reduction in TH-content in the striatum observed. These results are in agreement with those found by Czlonkowska *et al*, (1996) who demonstrated that the loss of TH staining in the SN and striatum up to 14 days after an MPTP injection in C57Bl/6 mice and with Kurosaki *et al*, (2004). The latter authors showed a reduction in TH immunostaining both in the SN and striatum up to 7 days after MPTP treatment in mice.

In the current study, parecoxib appears to protect the TH-content from MPTP-induced lesions in the SN, starting from the 7th until the 21st day after surgery. The same effect was observed after 14 and 21 days in the striatum. Nevertheless 24 h after surgery, parecoxib was unable to prevent the reduction of TH-content present in the SN. The molecular mechanism of parecoxib that attenuated TH reduction in the present study is unknown.

Present results suggest a possible neuroprotective effect conferred by parecoxib on this model of Parkinson's disease. In agreement with this, several lines of evidence show that COX-2 contributes to neuronal cell death both in vitro

and in vivo. Cyclooxygenase catalyzes the formation of prostaglandins, which involves the reduction of a hydroperoxide, resulting in the generation of free radicals (Klivenyi *et al*, 2003). Thus, Przybylkowski *et al*, (2004) showed that rofecoxib treatment started after an insult failed to protect neurons from MPTP toxicity. On the other hand, rofecoxib treatment started before MPTP administration had a clear neuroprotective effect, comparable with that observed in COX-2 knockout mice (Teismann *et al*, 2003). This kind of treatment was demonstrated to be effective in our model, corroborating the idea of a neuroprotective mechanism attributed to COX-2 inhibition (Przybylkowski *et al*, 2004). Finally, the possibility exists that COX-2 up-regulation could amplify the neurodegenerative process specifically in SNpc dopaminergic neurons, thus rendering these neurons more prone than other neurons to succumb to MPTP toxicity or Parkinson's disease injury (Teismann *et al*, 2003).

Another possible mechanism of neuroprotection conferred by parecoxib action is the reduction of the oxidative stress caused by MPTP. This neurotoxin is associated with an increase in ROS. Moreover, MPP⁺ translocates into synaptic vesicles where it stimulates the extrusion of synaptic dopamine (Rollema *et al*, 1988). The resulting excess cytosolic dopamine can readily undergo autooxidation, thus generating a huge burst of ROS, subjecting nigral neurons to oxidative stress (Lotharius and O'Malley, 2000). Alternatively, oxidation of cytosolic dopamine can also be catalyzed by enzymes such as COX-2 (Hastings, 1995), which is upregulated in the remaining nigral dopaminergic neurons in both MPTP-treated mice and in human post-mortem samples (Teismann *et al*, 2003). In fact the neuroprotective effect suggested for parecoxib is probably more strongly linked with its higher selectivity for COX-2 isoenzyme. Cyclooxygenases has been implicated in the signaling mechanisms of receptors other than dopamine including glutamate and GABA, both of which are known to play important roles in motor behavior (Lazarewicz *et al*, 1990; Mollace *et al*, 1995).

Therapeutically, the use of anti-inflammatory drugs to prevent DA degeneration in PD has not yet been formally tested in patients. The concept that anti-inflammatory agents may be beneficial in PD thus relies on pre-clinical studies

of in vitro or in vivo models of the disease. In vivo, various compounds, such as nonsteroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs), with their targets COX, NF κ B and others, steroids, immunophilins, thalidomide, and phosphodiesterase IV inhibitors have been studied with variable results (Hirsch *et al*, 2003).

Finally, parecoxib treatment (10 mg/kg one hour before the surgery and 2 mg/kg daily) was effective in preventing motor deficits 24 h after surgery (observed in the open field). In fact, parecoxib restored TH-content in the SN 7, 14 and 21 days after surgery, and in the striatum 14 and 21 days after surgery. In addition, parecoxib treatment reversed memory impairment from the 4th to 9th day (observed in the cued test).

In conclusion, the present results are suggestive of some important findings: 1) there is inverse relation between COX-2 and TH; 2) The neurodegenerative process started in the SN immediately (24h) after the surgery and remain until 21 days after MPTP-lesion (MPTP+saline); 3) Daily parecoxib treatment was able to protect, or even prevent, the neurodegeneration process in the SN 7 days after the injury; 4) In the striatum the reduction was detected only 14 days after the lesion and remain until 21 days after (MPTP+saline group). Future experiments will help to understand this neuroprotective process.

Acknowledgments

This work was supported by the CAPES and CNPq (Brazil). The authors would like to thank Mrs. Silvia N. C. Gennari for her capable technical assistance. SMZ, CC, RA, ST and MABFV are recipients of CNPq fellowships.

References

Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C (1998). Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* **71**: 1635-1642.

Beal MF (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. **2**: 325-332.

Betarbet R, *et al* (2002). Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* **24**: 308-318.

Birkmayer W, Riederer, P (1985). Biological aspects of depression in Parkinson's disease. *Psychopathology* **19**: 58-61.

Broadhurst PL (1960): *Experiments in psychogenetics*. Routledge and Kegan Paul, London. 52–71pp.

Calne BD (2001). Parkinson's disease is not one disease. *Parkinsonism and related disorders* **7**: 3-7.

Carson MJ and Sutcliffe JG (1999). Balancing function versus self defense: the CNS as an active regulator of immune responses. *J Neurosci Res* **55**: 1-8.

Chiba K, Trevor A, Castagnoli NJr (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **120**: 574-578.

Compston A (1995). Brain repair. *J Intern Med*. **237**: 127-134.

Czlonkowska A, Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A (1996). Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration* **5**:137-143.

Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MABF, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS (2001). Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* **124**: 9-18.

Devan BD, Donald RJ, White NM (1999). Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place – and cue – guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* **100**: 5-14.

Feng Z-H, Wang T-G, Li D-D, Fung P, Wilson BC, Liu B, Ali SF, Langenbach R, Hong JS (2002). Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett* **329**: 354– 358.

Ferro MM, Bellíssimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, Da Cunha C (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J of Neurosci Methods* **148**: 78-87.

Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG (1997). Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem* **69**: 1322-1325.

Gao HM, Liu B, Wanggin Z, Jau-Shyong H (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **24**: 395-400.

Gerlach M, Riederer P (1996). Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission* **103**: 987-1041.

German DC, Nelson EL, Liang CL, Speciale SG, *et al* (1996). The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* **5**: 299-312.

Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, Takahashi RN, Da Cunha C (2001). L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* **4**: 361– 370.

Hastings TG (1995). Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* **64**: 919-924.

Hassler R (1938). Pathologie der Paralysis Agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol* **48**: 387-476.

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* **224**: 1451-1453.

Hirsch EC, *et al* (2003). Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Trans* **50**: 79-88.

Hornykiewicz O (1966). Dopamine and brain function. *Pharmacol Rev.* **18**: 925-964

Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, van Elk E-J, Rozemuller AJ, Eikelenboom P (2002). The role of cyclooxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E2 secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* **951**: 218– 226.

Johnson N, Leone F (1974): *Statistic and experimental design*. Engineering

and Physical Sciences Wiley, New York.

Kitamura Y, *et al* (2003). Neuroprotective mechanisms of antiparkinsonian dopamine D₂-receptor subfamily agonists. *Neurochem Res* **28**: 1035-1040.

Klivenyl P, Gardian G *et al* (2003). Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitor against dopamine depletion in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* **21**: 191-198.

Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science* **273**: 1399-1402.

Kurkowska-Jastrzębska I, Babiuch M, Joniec I, Przybylkowski A, Czlonkowski A, Czlonkowska A (2002). Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *Int Immunopharmacol* **2**: 1213– 1218.

Kurkowska-Jastrzebska I, Litwin T, Joniec I, Ciesielska A *et al* (2004). Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol* **4**: 1307-1318.

Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H *et al* (2004). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**:57-67.

Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Costa E (1990). N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* **55**: 1875– 1881.

Lotharius J, O'Malley KL (2000). The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Biol Chem* **275**: 38581-38588.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin protein reagent. *J Bio Chem* **193**: 265–275.

Meissner W, Hill MP, Tison F, Gross CE *et al* (2004). Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends in Pharmacol Scie* **185**.

Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplessei M, Silveira R *et al* (2002). Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced nigral lesion. *Brain Res Bull* **58**: 41-47.

Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Thomas B (2000). Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res* **864**: 281–290.

Mollace V, Colasanti M, Rodino P, Lauro GM, Rotiroti D, Nistico G (1995). NMDA-dependent prostaglandin E2 release by human cultured astroglial cells is driven by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 793– 799.

Nakayama M, Chen J, Lowry T, Asakura T, Graham SH (1995). The immediate early gene cyclooxygenase is expressed in CA1 neurons destined for apoptotic cell death following global ischemia. *Abstr Soc Neurosci* **21**: 1268.

Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL, Nagayama T, Rose ME, Stettle RA, Isakson PC, Chen J, Graham SH (1998). Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10954– 10959.

Packard MG, McGaugh JL (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleos lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci* **106**: 439-446.

Paxinos G, Watson C (1986): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second ed. Academic Press, San Diego.

Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, *et al* (2004). Behavioural and neurochemical effects os phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. *European Journal of Pharmacology* **484**: 225-233.

Przedborski S (2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. **11**: S3-S7.

Przybylkowski A, Kurkowska-Jastrzebska I, Jonie I, Ciesielska A, *et al* (2004). Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Research* **1019**: 144-151. 2004.

Rollema H, Booth RG, Castagnoli NJr (1988). In vivo dopaminergic neurotoxicity of the 2-beta-methylcarbolinium ion, a potencial endogenous MPP+ analog. *Eur J Pharmacol* **153**:131-134.

Satyanarayana PSV, Naveen JK, Sukhjeet S *et al* (2004). Pharmacological profile of parecoxib: a novel, potent injectable selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *European Journal of Pharmacology* **491**: 69-76.

Scali C, Prosperi C, Vannucchi MG, Pepeu G, *et al* (2000). Brain inflammatory reaction in animal model of neuronal degeneration and its modulation by an anti-inflammatory drug: implication for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **12**: 1900–1912.

Sharifzadeh M, Tavasoli M, Naghdi N *et al* (2005). Post-training intrahippocampal infusion of nicotine prevents spatial memory retention deficits induced by the cyclooxygenase-2-specific inhibitor celecoxib in rats. *J Neurochem* **95**: 1078-1090.

Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* **125**: 109-125.

Sonsalla PK, Heikkila RE (1986). The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* **129**: 339-345.

Speciale SG (2002). MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol Teratol* **24**: 607-620.

Sriram K *et al* (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* **16**: 1474-1476

Sundström E, Strömberg I, Tsutsumi T, Olson I, *et al* (1987). Studies on the effect of 1-methy-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res*. **405**: 26-38.

Tanilla H, Bjorklund M, Riekkinen PJr (1998). Cognitive changes in mice following moderate MPTP exposure. *Brain Res Bull* **45**: 577-582.

Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, *et al* (2003). Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 5473– 5478.

Valledeoriola F, Nobbe F.A, Tolosa E (1997). Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. *J Neural Transm* **51**: 175-204.

Wu DC, Teismann P, Tieu K *et al* (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6145-6150.

Wyss-Coray T, Mucke L (2000) *Nat. Med* **6**: 973–974.

Figure Legends

Figure 1. Effects of parecoxib treatment on the latency time (s) of the water maze task - cued test version ($n = 10$ each group). The animals were submitted to four daily trials to find a submersed platform with a visual cued for 11 training days. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA followed by Tukey test showed a significant difference in comparison to control+saline group.

Figure 2. Representative trajectories of each group (a: control+saline; b: control+parecoxib; c: Sham+saline; d: Sham+parecoxib; e: MPTP+saline; f: MPTP+parecoxib) during the 4th day of training in the water maze task cued test version.

Figure 3. Western blotting of TH performed with samples obtained from **a** the SN and **b** the striatum 24 h after surgery with control, sham and MPTP groups treated with saline or parecoxib. The picture shown is a representative of a triplicate assay with three different rats per group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control+saline group. ANOVA followed by the Neuman-Keuls test.

Figure 4. Western blotting of TH performed with samples obtained from **a** SN and **b** striatum 7 days after surgery with control, sham and MPTP groups treated with saline or parecoxib. The picture shown is a representative of a triplicate assay with three different rats per group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control+saline group. ANOVA followed by the Neuman-Keuls test.

Figure 5. Western blotting of TH performed with samples obtained from **a** SN and **b** striatum 14 days after surgery with control, sham and MPTP groups treated with saline or parecoxib. The picture shown is a representative of a triplicate assay with three different rats per group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control+saline group. ANOVA followed by the Neuman-Keuls test.

Figure 6. Western blotting of TH performed with samples obtained from **a** SN and **b** striatum 21 days after surgery with control, sham and MPTP groups treated with saline or parecoxib. The picture shown is a representative of a triplicate assay with three different rats per group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared to the control+saline group. ANOVA followed by the Neuman-Keuls test.

Table 1. Effects of parecoxib treatment in control, sham and MPTP-lesioned groups of rats observed in the open field 24 h, 7, 14 and 21 days after surgery. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ each group) * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Two-way ANOVA followed by Tukey test showed a significant difference in comparison with the control+saline group.

Table 1

	Locomotion frequency	Rearing frequency	Immobility time (s)
24 h			
Control+saline	86.5 ± 7.4	28.0 ± 1.9	47.0 ± 9.8
Control+parecoxib	70.1 ± 7.0	31.1 ± 4.1	40.6 ± 8.8
Sham+saline	86.0 ± 9.1	23.7 ± 3.7	26.7 ± 7.6
Sham+parecoxib	75.3 ± 11.0	25.4 ± 6.6	48.6 ± 9.9
MPTP+saline	32.6 ± 3.8*	12.4 ± 1.9*	58.4 ± 14.9
MPTP+parecoxib	105.0 ± 5.9	21.4 ± 3.0	1.1 ± 0.6*
7 th day			
Control+saline	45.3 ± 9.1	16.1 ± 2.7	76.6 ± 18.8
Control+parecoxib	47.1 ± 7.5	20.4 ± 2.8	72.3 ± 11.1
Sham+saline	68.4 ± 12.2	24.7 ± 4.9	81.1 ± 25.4
Sham+parecoxib	87.4 ± 15.0	28.9 ± 5.8	51.5 ± 15.3
MPTP+saline	102.7 ± 17.4*	32.7 ± 2.6*	15.3 ± 7.6*
MPTP+parecoxib	87.1 ± 11.1	21.8 ± 2.8	31.3 ± 9.0
14 th day			
Control+saline	22.5 ± 4.2	14.3 ± 4.2	156.7 ± 20.8
Control+parecoxib	41.3 ± 7.6	18.7 ± 3.0	95.0 ± 13.2
Sham+saline	55.1 ± 11.8	17.6 ± 4.0	79.6 ± 23.9
Sham+parecoxib	50.2 ± 11.4	14.5 ± 5.0	83.5 ± 21.7
MPTP+saline	92.7 ± 19.8*	20.0 ± 5.3	36.2 ± 15.5**
MPTP+parecoxib	61.8 ± 8.3	27.8 ± 7.0	52.0 ± 15.5**
21 st day			
Control+saline	25.1 ± 5.8	9.7 ± 0.9	125.4 ± 14.5
Control+parecoxib	24.3 ± 6.4	13.6 ± 3.9	103.0 ± 24.7
Sham+saline	52.4 ± 10.2	14.3 ± 2.8	97.9 ± 33.0
Sham+parecoxib	48.7 ± 15	13.9 ± 4.3	66.4 ± 20.0
MPTP+saline	57.1 ± 13.1	17.9 ± 4.4	64.3 ± 22.3
MPTP+parecoxib	90.0 ± 19.6*	25.0 ± 4.1	22.9 ± 11.1*

Figure 1

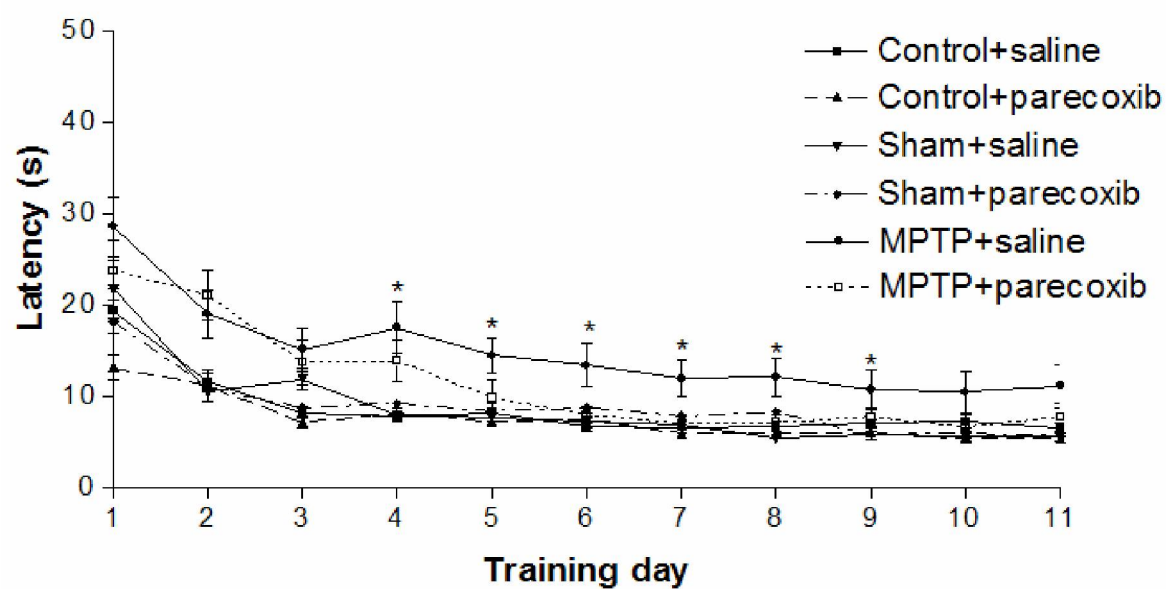


Figure 2

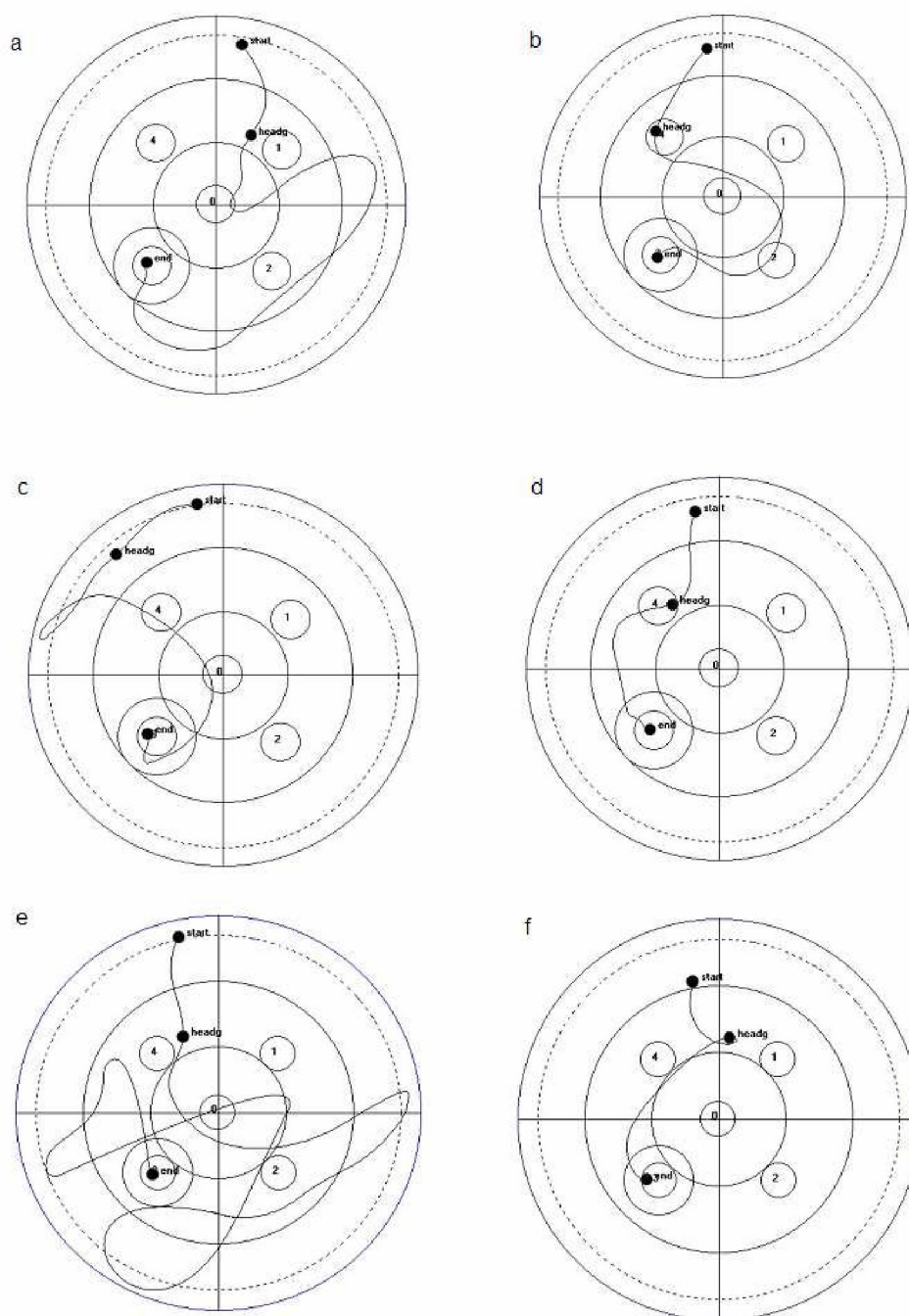


Figure 3

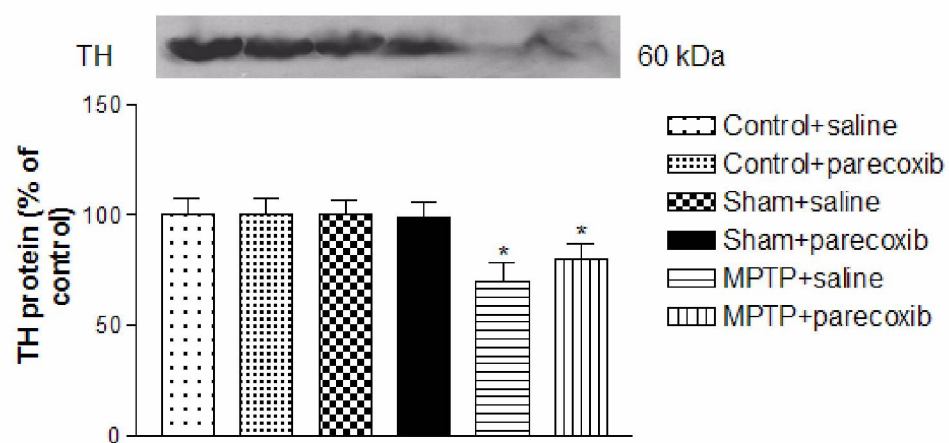
a

Figure 3

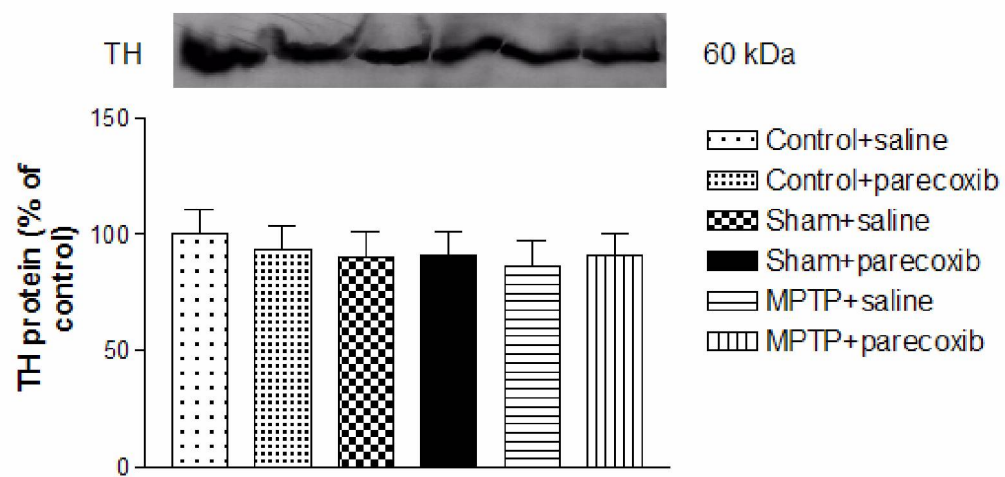
b

Figure 4

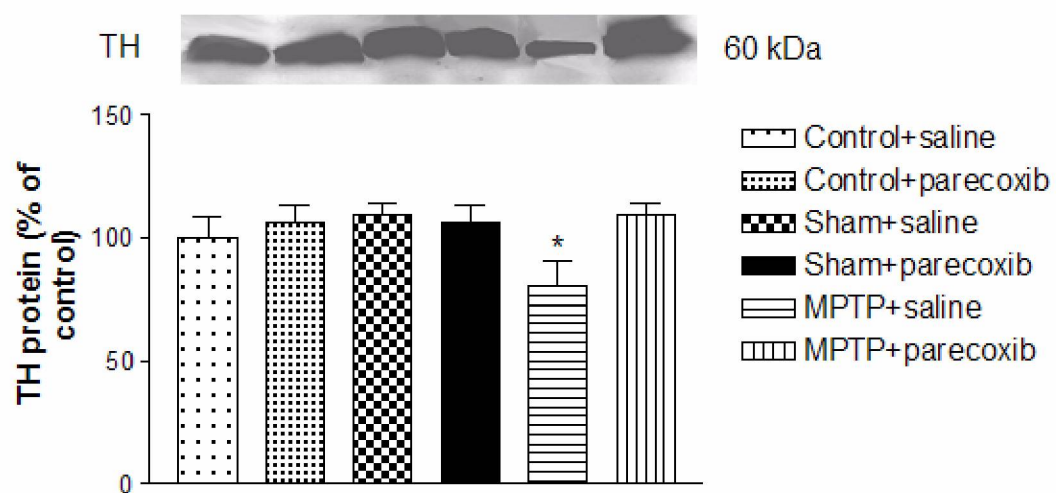
a

Figure 4

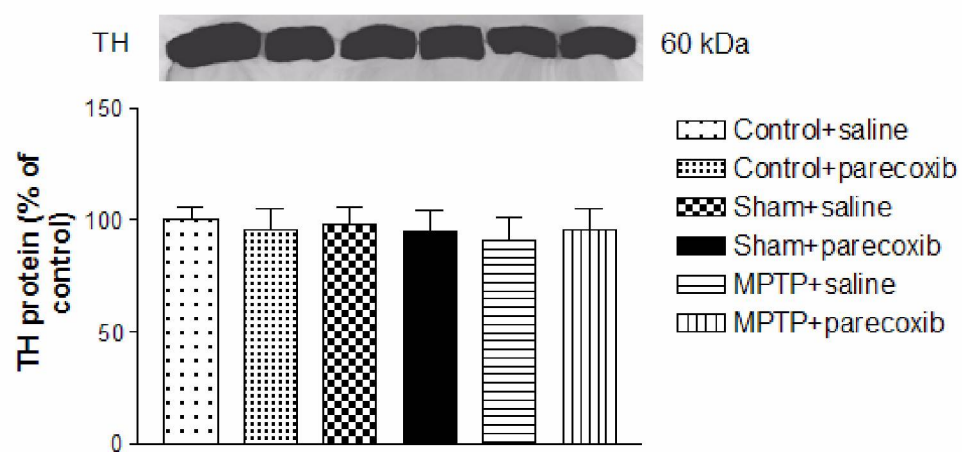
b

Figure 5

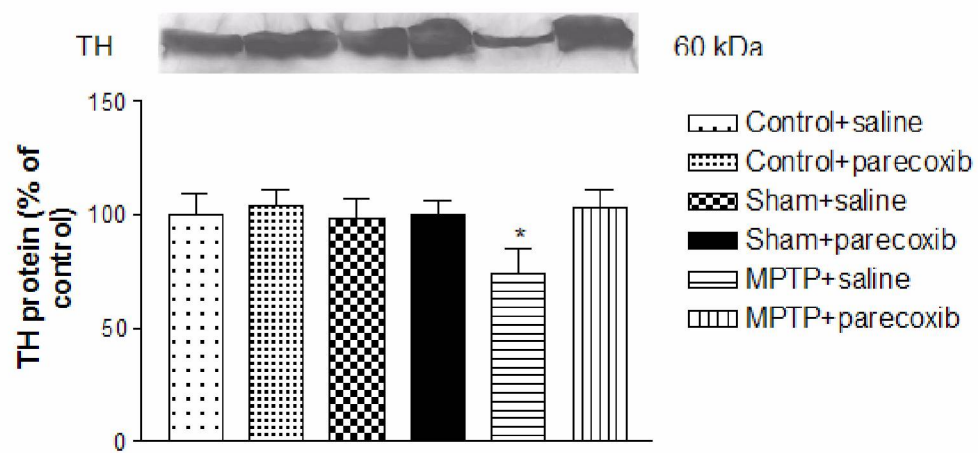
a

Figure 5

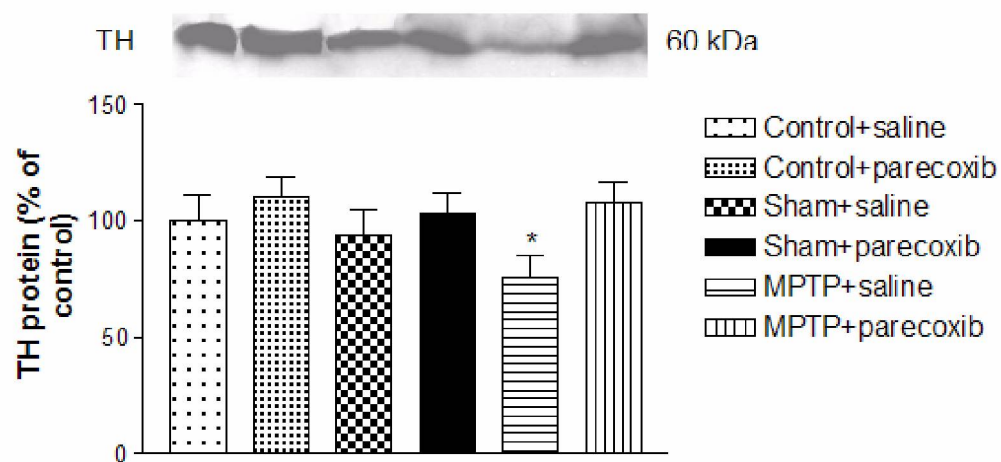
b

Figure 6

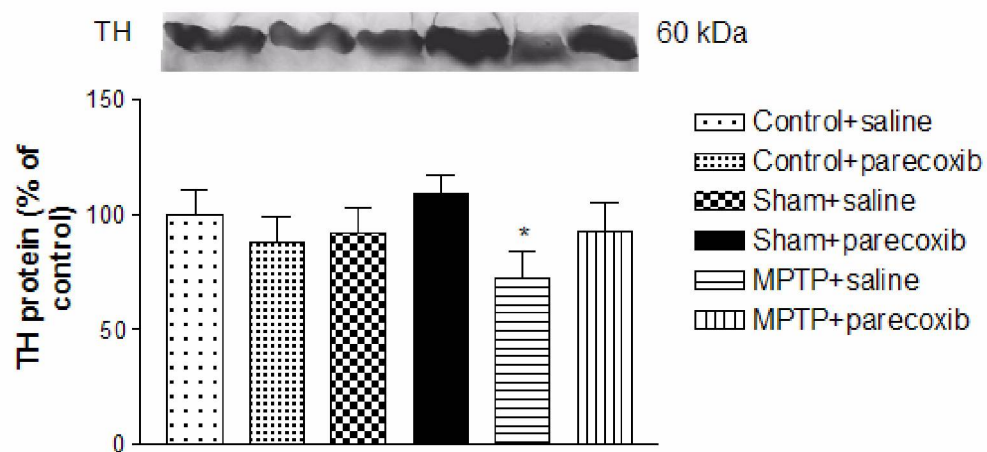
a

Figure 6

b